Untersuchungen zur Synthese und Sekretion einer Exoprotease aus Serratia marcescens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN SCHMITZ
aus Mainz

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0033

Untersuchungen zur Synthese und Sekretion einer Exoprotease aus Serratia marcescens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN SCHMITZ
aus Mainz

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 1983
Dekan: Professor Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter: Dr. K. Hantke

Meinen Eltern

Diese Dissertation wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Volkmar Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. V. Braun für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit;

Herrn Professor Dr. W. Bessler für die Hilfe bei der Immunisierung;

Herrn Professor Dr. K. Beyreuther für die Durchführung des Edman-Abbaus;

Herrn Dr. R. Dreher, Herrn S. Mollner und Herrn Dr. W. Rollinger für die Durchführung der Aminosäureanalysen;

Frau H. Wolff für die Anfertigung der Photographien;

Herrn K. Wusch für die Anfertigung der Zeichnungen;

der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung

und generell allen Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II für die stete Hilfsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Chemikalien und Enzyme	9
2.2	Nährmedien	10
2.3	Bakterienstämme	11
2.4	Kulturbedingungen	11
2.4.1	Zucht des Wildtyps in TY-Medium	12
2.4.2	Zucht der Cysteinmangelmutante in AS-GBM (Cysteinmangelbedingungen)	12
2.5	Gewinnung des Zellüberstandes	12
2.6	Zellaufschluß und Zellfraktionierung	13
2.6.1	Frenchpress-Aufschluß	13
2.6.2	Aufschluß durch Kochen in SDS	13
2.6.2.1	Gewinnung von Zellextrakten	13
2.6.2.2	Gewinnung von Kulturextrakten	14
2.6.3	EDTA/Lysozym-Aufschluß	14
2.6.4	Ultraschall-Aufschluß	15
2.7	Test der Proteaseaktivität	16
2.8	Proteinbestimmung	17
2.8.1	Proteinbestimmung nach Lowry	17
2.8.2	Proteinbestimmung mit Fluram	17
2.9	Test der Aminosäurezusammensetzung	17
2.9.1	Aminosäureanalyse	17
2.9.2	Perameisensäureoxidation	18
2.9.3	Bromcyanspaltung	18
2.10	Gelelektrophorese	19
2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.10.2	Autoradiographie	20
2.10.3	Partielle Proteolyse im SDS-Acrylamidgel	20
2.11	Gewinnung und Test des Anti-Exoprotease-Serums	21
2.11.1	Immunisierung und Serumgewinnung	21
2.11.2	Doppeldiffusion nach Ouchterlony	22

		Seite
2.11.3	Immunfällung	22
2.11.3.1	Immunfällung ohne Protein A/Sepharose-Behandlung	22
2.11.3.2	Immunfällung mit Protein A/Sepharose	23
2.12	Isolierung der Protease I und II	23
2.12.1	Erste Isolierung der Protease II	23
2.12.2	Zweite Isolierung der Protease II	25
2.12.3	Isolierung der Protease I	26
2.13	Sequenzierung der Protease I und II	26
2.13.1	Sequenzierung mit Carboxypeptidase A und B	26
2.13.2	Sequenzierung nach Edman	28
2.14	"Export"-Experimente	28
2.14.1	Protease II-Freisetzungsexperiment	28
2.14.2	Inkubation der Protease I in Proteasemangelmutantenüberstand	29
2.14.3	Inkubation der Proteasen in Puffer	29
2.14.4	Inkubation der Proteasen bei 95°C	29
2.15	Wachstums- und Proteaseaktivitäts-Messungen bei 18°C und 42°C und in Anwesenheit von "Sekretionsinhibitoren"	30
2.16	Radioaktive Markierung	30
2.16.1	Messung des radioaktiven Einbaus	30
2.16.2	Markierungsversuche mit ^{35}S-Methionin (und ^{35}S-Cystein)	31
2.16.2.1	Markierung mit anschließender Zellfraktionierung	31
2.16.2.2	Markierung zur Identifizierung des Proteins III	32
2.16.2.3	Markierung bei 18°C und 42°C	32
2.16.2.4	Markierung mit ^{35}S-Cystein	32
2.16.3	"Pulse-chase"-Versuch mit ^{35}S-Methionin	32
2.16.4	Markierungsversuche mit ^{14}C-Aminosäuren	32
2.16.4.1	Grundprinzip	32
2.16.4.2	Markierung der Zellen verschiedener Zellstadien	34
2.16.5	"Pulse-chase"-Versuche mit ^{14}C-Aminosäuren	34
2.16.5.1	"Pulse-chase"-Versuche unter normalen Wachstumsbedingungen	34
2.16.5.2	"Pulse-chase"-Versuch mit "Sekretionsinhibitoren"	35
2.16.5.3	"Pulse-chase"-Versuch bei verzögerter Sekretion	35

Seite

3.	ERGEBNISSE	
3.1	Suche nach einer Proteasevorstufe unter normalen Wachstumsbedingungen	36
3.1.1	Immunfällung aus Zellüberstand	36
3.1.2	Partielle Proteolyse der Protease I und II	39
3.2	Isolierung und Charakterisierung der Protease II	41
3.2.1	Erste Isolierung der Protease II	42
3.2.2	Zweite Isolierung der Protease II	46
3.2.3	Isolierung der Protease I	50
3.2.4	Test der immunologischen Identität der isolierten Proteasen	52
3.2.5	Aminosäureanalyse der Protease I und II	53
3.2.6	Bestimmung der C-terminalen Sequenz	55
3.2.7	Bestimmung der N-terminalen Sequenz	60
3.3	Test der Freisetzung von Protease II durch Zelllyse	62
3.4	Versuche zum Nachweis der Entstehung von Protease II im Kulturüberstand	64
3.4.1	Einfluß des Mediums auf die Protease II-Bildung	64
3.4.2	Einfluß des pH-Wertes auf die Protease II-Bildung	65
3.4.3	Einfluß der Temperatur auf die Protease II-Bildung	67
3.5	Zwischenbilanz	69
3.6	Suche nach einer zellgebundenen Proteasevorstufe unter normalen Wachstumsbedingungen	70
3.7	Versuch der Anreicherung eines Proteasevorläufers in der Cysteinmangelmutante	72
3.7.1	Wachstum und Proteaseausscheidung	73
3.7.2	^{35}S-Methionin-Markierung	75
3.7.3	Versuche zum Nachweis von Methionin und Cystein in der Exoprotease	78
3.7.3.1	Bromcyanspaltung	78
3.7.3.2	^{35}S-Cystein-Markierung	80
3.8	Versuche zur Identifizierung des Proteins III	80
3.8.1	Partielle Proteolyse	81
3.8.2	Versuche mit der Cysteinmangelmutante	83
3.8.2.1	Pulsmarkierung unter Cysteinmangelbedingungen	83

		Seite
3.8.2.2	"Pulse-chase"-Versuch unter Cysteinmangelbedingungen	84
3.8.3	Versuche mit dem Wildtyp	84
3.8.3.1	Markierung in TY-Medium	85
3.8.3.2	"Pulse-chase"-Versuche in TY-Medium	86
3.9	Versuch der Anreicherung eines Proteasevorläufers bei 18°C und 42°C	88
3.10	Versuche zur Anreicherung einer Proteasevorstufe durch Einsatz von "Sekretionsinhibitoren"	91
3.10.1	Wachstum und Proteasesekretion	91
3.10.1.1	Einfluß von Procain und Phenäthylalkohol	91
3.10.1.2	Einfluß von TLCK und EDTA	95
3.10.1.3	Einfluß von Rifampicin	99
3.10.1.4	Einfluß von Natriumazid	101
3.10.2	Test der intrazellulären Aktivität nach Zugaben von "Proformanreicherungssubstanzen" und nach Temperatur-Schift auf 18°C bzw. 42°C	103
3.10.3	Markierung in Anwesenheit der "Sekretionsinhibitoren"	105
3.10.3.1	Markierung in TY-Medium	106
3.10.3.2	Markierung unter Cysteinmangelbedingungen	108
3.10.4	"Pulse-chase"-Versuch	110
3.10.5	Partielle Proteolyse	115
3.10.6	Lokalisation des zellgebundenen 52 K Proteins	116
3.11	Versuche bei verzögerter Sekretion	119
3.11.1	Pulsmarkierungsversuche	119
3.11.2	"Pulse-chase"-Versuch	121
4.	DISKUSSION	123
5.	ZUSAMMENFASSUNG	139
6.	LITERATURVERZEICHNIS	140

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bidest.	doppelt destilliert
Bisacrylamid	N,N'-Methylendiacrylamid
Ci	Curie
DEAE	Diäthylaminiäthyl
DNase	Desoxyribonuclease
dest.	destilliert
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Di Natriumsalz
g	Erdbeschleunigung
GBM	Glycerolbasalmedium
l	Liter
M	molar
Min.	Minute
N	normal
OD_x	Optische Dichte bei x nm
OPA	Orthophenanthrolin
PEA	Phenäthylalkohol
psi	pounds per square inch
PU	Proteaseeinheit
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
S. marc.	Serratia marcescens
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TLCK	Tosyl-Iysyl-chlormethylketon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TY-Überstand	Überstand von in TY-Medium gezüchteten Kulturen

Folgende Ausdrücke wurden aus dem Englischen übernommen:
"pulse-chase", "chase", "processing".

1. EINLEITUNG

Jede Zelle ist von einer Zellhülle umgeben, die ihr die Kommunikation mit dem sie umgebenden Milieu ermöglicht und sie gleichzeitig vor negativen Umwelteinflüssen schützt. Nach der Art ihrer Zellwand werden die Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschieden. Beiden gemeinsam ist die Abgrenzung des Cytoplasmas durch die innere Membran oder Cytoplasmamembran, die im wesentlichen Systeme für die selektive Stoffaufnahme, die Energiegewinnung und die Synthese verschiedener Membranbestandteile trägt. Die Cytoplasmamembran enthält Phospholipide und Proteine in ungefähr gleicher Menge (85). Die amphipathischen Lipidmoleküle sind so ausgerichtet, daß eine Lipiddoppelschicht mit interner hydrophober und externer hydrophiler Phase entsteht, in der die Proteine, periphere oder integrierte, eingebettet sind. An die innere Membran schließt sich die Mureinschicht, ein Netzwerk aus Zuckerketten, die durch kurze Peptidbrücken quervernetzt sind, an (124). Dieser Mureinsacculus liefert die mechanische Stabilität der Zelle, schützt sie vor dem hohen osmotischen Druck im Zellinnern und ist wahrscheinlich mitverantwortlich für die jeweilige Gestalt der Zelle (85). Die Zellwand der Gram-positiven Bakterien besteht aus mehreren Mureinschichten (bis zu 40), an die noch zusätzlich Teichonsäuren, Teichuronsäuren oder Polysaccharide kovalent gebunden sein können (124). Die Zellwand der Gram-negativen Bakterien ist komplexer aufgebaut. Die Untersuchungen hierzu wurden hauptsächlich an Escherichia coli und Salmonella typhimurium durchgeführt. Die äußere Membran anderer Gram-negativer Bakterien, also auch die von Serratia marcescens, ist der Membran von E. coli ähnlich (16, 25, 51, 76, 85, 145). Der relativ dünne, wahrscheinlich einschichtige Mureinsacculus ist über das kovalent gebundene Lipoprotein in der äußeren Membran verankert (12). Zwischen der inneren und äußeren Membran befindet sich der periplasmatische Raum, der Proteine (104) und Oligosaccharide enthält (68). Bei den Proteinen handelt es sich hauptsächlich um hydrolytische Enzyme mit katabolischer Funktion (z.B. Proteasen, Nucleasen, Phosphatasen), um Bindeproteine (z.B. Maltosebindeprotein), die am Stofftransport und an der Chemotoxis beteiligt sind, und um degradive oder modifizierende Proteine, die die Zelle vor toxischen Substanzen schützen (z.B. ß-Lactamasen). Die negativ geladenen Oligosaccharide scheinen eine Rolle bei

der Osmoregulation zu spielen.
Die äußere Membran ist der inneren zwar morphologisch ähnlich (106), weist aber eine andere Zusammensetzung auf. Während die innere Lipidlamelle aus Phospholipiden besteht, enthält die Außenseite das für diese Membran charakteristische Lipopolysaccharid (LPS) (88, 106), ein Glykoprotein, das im wesentlichen die antigenen Eigenschaften der Zelle bestimmt und einen großen Einfluß auf die Membranpermeabilität ausübt (13). Ein weiteres typisches Merkmal der äußeren Membran ist der hohe Anteil einiger weniger Proteine mit bis zu 10^5 Kopien/Zelle (85, 35), wobei das Lipoprotein, das zu 2/3 in freier Form und zu 1/3 mureingebunden vorliegt, mit ca. 5 bis 8×10^5 Kopien/Zelle das häufigste Protein darstellt (85, 107). Neben diesen 3 - 5 Hauptproteinen wurden bis zu 50 weitere "Nichthauptproteine" (darunter auch weitere Lipoproteine, Ref. 59), deren Menge zum Teil vom Stoffwechsel abhängt, nachgewiesen (14). Der Proteinanteil der äußeren Membran schwankt und kann bis zu 75 % betragen (85). An der Außenseite der äußeren Membran können neben den Zuckerketten der LPS-Moleküle noch Pili, Flagellen und Fimbrien in das Medium hinausragen (85). Einige Stämme sind außerdem von einer Polysaccharidkapsel (3) umgeben, die neben dem LPS oft für die Pathogenität des Organismus mitverantwortlich ist. Im Gegensatz zur Zellwand Gram-positiver Bakterien stellt die äussere Membran der Gram-negativen Bakterien eine zusätzliche Permeationsbarriere dar, die hydrophilen Stoffen durch den Lipidanteil und hydrophoben Stoffen durch die hydrophilen Zuckerketten des LPS den Eintritt erschwert (13). Die Aufnahme lebenswichtiger Nährstoffe wird deshalb im wesentlichen von Membranproteinen übernommen, die wassergefüllte Poren bilden, die den Durchtritt hydrophiler Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Ionen) bis zu einer Ausschlußgrenze von 600 - 700 Dalton erlauben (32, 100, 101). Für Stoffklassen mit Molekulargewichten oberhalb der Ausschlußgrenze der Porine existieren hochaffine Aufnahmesysteme (14, 15). In ihrer Funktion Poren zu bilden, liegen die Porine als Transmembranproteine vor, sind somit von außen zugänglich und dienen deshalb einer Reihe von Phagen und/oder Colicinen als Rezeptoren (14). Die Membrankomponenten, deren Menge je nach Stoffwechsellage großen Schwankungen unterliegen kann, stehen in vielseitiger Wechselbeziehung (85, 107). Als Beispiel seien hier die LPS-LPS-Komplexe genannt, die durch Ca^{2+} stabi-

lisiert werden und mit dem OmpA-Protein interagieren, welches seinerseits mit dem Lipoprotein und dem Murein assoziiert ist. Zusammen mit dem Lipoprotein-Mureinkomplex sind diese Komponenten für die hohe Stabilität der äußeren Membran verantwortlich. Auch ist bekannt, daß die Porine als Trimere vorliegen, die erst in Assoziation mit dem LPS und vermutlich mit dem Murein funktionstüchtig werden (85).

Der Ort der Proteinbiosynthese ist das Cytoplasma. Alle nicht cytoplasmatischen Proteine müssen von dort selektiv in die einzelnen subzellulären Kompartimente transportiert werden. Somit muß die Zelle Mechanismen entwickelt haben, die diesen hydrophilen Makromolekülen den Transfer durch hydrophobe Membranen ermöglicht und gleichzeitig den jeweiligen endgültigen Standort festlegen. Ähnlich den eukaryontischen Zellen, die vielfach kompartimentiert sind (z.B. Organellen) und Proteine sezernieren, existieren bei den Gram-negativen Bakterien mehrere Zielorte: a) Die Cytoplasmamembran, b) das Periplasma, c) die äußere Membran, d) das die Zelle umgebende Medium. Obwohl Palade schon 1955 Pionierarbeit auf diesem Gebiet leistete (114), wurde die eigentliche Ära der Proteinsekretionsforschung durch die von Milstein (91) 1972 vorgeschlagene und von Blobel und Dobberstein (6) 1975 weiterentwickelte Signalhypothese, für die sekretorischen Proteine der Eukaryonten, eingeleitet. Seitdem wurden die Untersuchungen von einer Reihe von Arbeitsgruppen auch auf die Prokaryonten, besonders auf Escherichia coli, ausgeweitet. Mehrere Hypothesen über den Mechanismus des Proteinexports wurden inzwischen aufgestellt (31, 90). Die Modelle, die die meisten Befunde bezüglich der beobachteten ko- und posttranslationalen Sekretion erklären, werden im folgenden dargestellt.

Die Mehrzahl der bakteriellen exportierten Proteine wird gemäß der, aufgrund reichhaltiger Befunde, auf die Prokaryonten übertragenen Signalhypothese kotranslational durch die innere Membran befördert. Folgende Schritte werden postuliert: a) Die Proteinsynthese beginnt an freien Ribosomen im Cytoplasma. b) Das aus dem Ribosom herauskommende Aminoende, das Signalpeptid, bindet an die innere Membran, was eine Anheftung der Polysomen an die Membran zur Folge hat. c) Die Bindung des Signalpeptids an die Membran bewirkt die Bildung einer Membranpore, an der Proteine der inneren Membran und der Ribosomen beteiligt sind. d) Die wachsende Poly-

peptidkette wird bei weiterlaufender Synthese linear durch diesen Tunnel geschoben. e) An der Außenseite der inneren Membran wird das Signalpeptid ko- oder posttranslational von einer Protease abgespalten ("processing"). Neben dem Nachweis, daß die Synthese verschiedener periplasmatischer und äußerer Membranproteine an membrangebundenen Ribosomen erfolgt (21, 121, 122), konnte die kotranslationale Sekretion auch direkt durch extrazelluläre Markierung der wachsenden Polypeptidkette während ihres Transfers durch die innere Membran bei sekretorischen Proteinen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien gezeigt werden (132).

Ein Translokationsmodell, das weder kotranslationalen Transport noch eine spezielle Exportmaschinerie fordert, wurde von Wickner vorgeschlagen (141). Nach dieser Membran-Trigger-Hypothese hat das Signalpeptid die Rolle, die Faltung der wachsenden Polypeptidkette so zu beeinflussen, daß eine lösliche, exportkompetente Proteinkonformation entsteht. Durch den Kontakt mit der Membran wird das Protein, noch während oder erst am Anschluß an die Synthese, in eine neue Konfiguration gedrängt, die ihm erlaubt,spontan in oder durch die Membran zu gelangen. Die Abspaltung des Signalpeptids erleichtert diese Konformationsänderung und macht den Vorgang irreversibel. Obwohl dieses Modell auch kotranslationalen (wenn auch nicht vektoriellen) Export erlaubt, wird es besonders zur Erklärung posttranslationaler Sekretionsschritte herangezogen. Es wurde für den posttranslationalen Einbau des an freien Ribosomen synthetisierten Vorläufers des Haupthüllproteins des Phagen M13 in die innere Membran postuliert (46, 141) und würde auch am besten die nach vollendeter Synthese stattfindende Sekretion der TEM ß-Lactamase in das Periplasma erklären (69). Daß tatsächlich keine Exportmaschinerie zur Insertion des Haupthüllproteins in die Membran nötig ist, zeigte sein korrekter Einbau in Liposomen, die nur Phospholipid und die gereinigte Signalpeptidase enthielten (140).

Alle bisher untersuchten Proteine der Gram-negativen Bakterien, die die innere Membran passieren, wurden als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert (Zusammenstellung, Ref. 90). Eine Ausnahme hierbei machen einige Colicine (ColE1, Ref. 65, ColE3, Ref. 65, ColA, Ref. 134), wobei zumindest beim Colicin E1 eine dem Signalpeptid des Lipoproteins

ähnliche Sequenz am C-Terminus nachgewiesen wurde (143), die, wie beim Ovalbumin (80), als internes Signal der Translokation dienen könnte (144). Obwohl die inzwischen für eine Vielzahl von Signalpeptiden aufgeklärten Primärstrukturen mit 15 - 30 Aminosäuren wenig Homologie aufweisen (Zusammenstellung, Ref. 90), zeigen alle, auch die der Eukaryonten (71), in ihrer Polarität identische Eigenschaften: Dem stark basischen Aminoende mit 2 - 8 Aminosäureresten folgt eine vorwiegend hydrophobe Sequenz von 15 - 19 Aminosäuren, die mit einer Aminosäure mit kurzer Seitenkette, vor der Spaltstelle, endet. Ob der positiv geladene N-Terminus der nascenten Polypeptidkette an die negative Oberfläche der Membran (Protein-Phospholipid-Interaktion) bindet und der hydrophobe Bereich des Signals in einer Schleife durch die Membran geschoben wird, wie dies von Inouye vorgeschlagen wurde (Loop-Modell, Ref. 35) oder ob eine Protein-Protein-Interaktion, z.B. über ein lösliches "signal recognition protein" (136 - 138) mit einem membrangebundenen Rezeptor ("dogging protein", Ref. 89) vorliegt, wie dies für das eukaryontische System (ER-Membran) gezeigt werden konnte, ist noch nicht geklärt.

Besonders genetische Studien bestätigten die essentielle Rolle des Signalpeptids für die Proteinsekretion und lieferten Hinweise auf die Existenz einer Exportmaschinerie. Mit Hilfe der von Casadaban (22) entwickelten und von Beckwith et al. (2, 38) in die Proteinsekretionsforschung eingeführte Genfusionstechnik wurden Hybridproteine hergestellt, bei denen der N-Terminus des cytoplasmatischen Enzyms ß-Galaktosidase durch verschieden lange N-terminale Sequenzen von Proteinen des Periplasmas oder der äusseren Membran ersetzt war. Die Befunde bezüglich der Lokalisation derartiger Hybridproteine ergaben, daß ein intaktes Signalpeptid zwar die Voraussetzung nicht aber genügend für den Exportschritt ist. Während ein im hydrophoben Bereich mutiertes Signalpeptid im allgemeinen zum Sekretionsstop führt, kann ein intaktes Signalpeptid zwar den Export des cytoplasmatischen Proteins in die äußere Membran initiieren, aber nur dann, wenn eine entsprechende Folgesequenz vorhanden ist (2, 38, 40, 70). D.h. auch die Struktur des reifen Proteins scheint eine Rolle beim Export zu spielen, wobei sich dies in den bisher untersuchten Fällen nicht auf den C-Terminus bezieht (19, 62, 69, 116). Fehlen bestimmte Folgesequenzen oder sind sie nicht kompetent, so kann dies zur Verstopfung der Membran durch

das Hybridmolekül führen, was die Anhäufung von verschiedenen Vorläuferproteinen im Cytoplasma zur Folge hat, so daß von speziellen Exportstellen in der Membran ausgegangen werden kann (2, 53, 61). Ein Hinweis auf die Beteiligung von Ribosomen und Membrankomponenten am Proteinexport lieferten, neben biochemischen Daten (126), pleiotrophe Mutanten (108, 139) und Suppressormutanten, bei denen der durch ein defektes Signalpeptid bedingte Exportstop aufgehoben wurde (39, 109, 110). Der processing-Schritt, der für viele Proteine ko- und posttranslational erfolgen kann (43, 66, 67, 133), ist für die Translokation durch die Cytoplasmamembran wohl nicht essentiell, was aus genetischen (70, 79) und biochemischen (34, 48) Daten hervorgeht. Vorraussetzung für die Signalpeptidabspaltung und den Export ist allerdings ein normaler physiologischer Status der Membran. Bei veränderter Membranfluidität- oder permeabilität (34, 42, 48, 75, 111) und bei inhibiertem Energiemetabolismus (27, 29, 41, 113, 115) wurde nämlich die Akkumulation verschiedener Proformen beobachtet.
Die Frage, wie die Proteine nach erfolgtem Durchtritt durch die innere Membran in oder durch die äußere Membran gelangen, ist noch weitgehend offen. Hier könnten die von Bayer entdeckten Adhäsionsstellen (3a) zwischen innerer und äußerer Membran eine Rolle spielen, zumal Kapselpolysaccharide (3), Lipopolysaccharid (97) bei E. coli und Porine bei S. typhimurium (127) auf diesem Wege in die äußere Membran gelangen. Hall und Silhavy postulieren, daß sogenannte "Stop-transfer"-Sequenzen, ähnlich wie bei eukaryontischen Membranproteinen beobachtet (123), den Transfer des λ-Rezeptors durch die innere Membran stoppen und das Protein danach eventuell über Vesikelbildung in die äußere Membran befördert wird (49). In einer eher theoretischen Betrachtung schlägt Babel zweifache Signalsequenzen (für innere und äußere Membran) oder Porenbildung durch beide Membranen vor (7). Nach diesen Vorstellungen wäre also der periplasmatische Raum keine "Zwischenstation" auf dem Weg in die äußere Membran. Gerade dies scheint aber zumindest für einige Proteine, die an die Außenseite der äusseren Membran oder bis in das Medium ausgeschieden werden, der Fall zu sein. Besonders durch Anwendung von in vivo und in vitro genetischen Methoden konnten bei E. coli die gesamten Gene und Genprodukte, die an der Synthese und an dem Export der K88 ab Fimbrien (95, 96) und des λ-Hämolysins (45, 102) beteiligt sind identifiziert und charaktersiert werden. Beide Proteine werden transient im Periplasma akkumuliert bevor die Trans-

lokation durch die äußere Membran erfolgt (96, 129). Hierzu sind beim Hämolysin zwei äußere Membranproteine (135), bei den Fimbrienuntereinheiten zwei periplasmatische und ein äußeres Membranprotein nötig (96). Auch bei pleiotrophen Exportmutanten von Aeromonas hydrophila scheint die Anhäufung verschiedener extrazellulärer Proteine im Periplasma durch den Ausfall zweier äußerer Membranproteine bedingt zu sein (57). Bei den Gram-positiven Bakterien wird die Exkretion von Hydrolasen und Toxinen häufiger beobachtet, was auf ihre permeablere Zellwand zurückzuführen ist (44, 74). Trotzdem wurde auch hier die Anhäufung zellgebundener Proteine vor ihrer Freisetzung beschrieben. Dies gilt z.B. für das Enterotoxin B von Staphylococcus aureus (133) und für die ß-Lactamase von Bacillus licheniformis (63). Das letztere sehr gut untersuchte Protein ist insofern interessant, als es wie das Lipoprotein von E. coli N-terminal modifiziert wird und über den Lipidteil an der Aussenseite der Cytoplasmamembran gebunden ist (23, 72, 98, 99). Vermutlich gehen daraus die extrazellulären Formen hervor (23, 63, 128). Inzwischen wurden, auch bei anderen Stämmen, eine Reihe von Lipoproteinen nachgewiesen, so daß vermutet wird, daß die Lipoproteine bei Gram-positiven Bakterien den periplasmatischen Proteinen der Gram-negativen Bakterien entsprechen (72, 73, 98, 99). Die Anhäufung zellgebundener aktiver Enzyme (5, 10, 52, 86) oder inaktiver Vorstufen (64) vor der Sekretion wurde zwar für weitere extrazelluläre Proteine beschrieben, scheint aber kein obligater Sekretionsschritt zu sein (8, 20, 73, 130, 131). In den meisten Fällen wurden allerdings der molekulare Mechanismus der Sekretion extrazellulärer Proteine bei Mikroorganismen (Zusammenstellung, Ref. 74, 117), mit Ausnahme der obigen Beispiele, nicht eingehend untersucht.

Serratia marcescens gehört zu den wenigen Gram-negativen Bakterien, das Exoenzyme (18, 44, 52, 74, 142), darunter auch bis zu vier Exoproteasen (pro Stamm), in das Medium ausscheidet (20, 142). Der Stamm S. marcescens ATCC 25419, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, synthetisiert eine Exoprotease, die nach Induktion in Peptid-haltigem Medium bevorzugt gegen Ende des logarithmischen Wachstums freigesetzt wird (17). Das Protein wurde von mehreren Arbeitsgruppen isoliert (17, 33) und stimmt in den getesteten Eigenschaften weitgehend mit der Protease aus zwei weiteren S. marcescens-Stämmen (18, 78) und aus S. piscatorium (92)

überein. Die durch Zn^{2+} aktivierte Metalloprotease (78, 94), die aus einer Polypeptidkette besteht, hat ein Molekulargewicht von ca. 51.000 bis 55.000 Dalton (17, 18, 33, 78). Sie wird als Kohlehydrat- (78, 92) und S-haltige Aminosäuren- (17, 78, 92) freies Enzym beschrieben und scheint, außer Dipeptiden, eine Reihe von Peptiden und Proteinen als Substrat zu benutzen (17, 33, 93).

Als die Untersuchungen zum Sekretionsmechanismus der Exoprotease begannen, war zwar die "inaktive" Freisetzung von Colicinen durch Zellyse (65, 119, 134), nicht aber eine aktive Proteinexkretion durch die innere und äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien bekannt. Bei den Gram-positiven Bakterien wurde von einer Exoprotein-Synthese über Signalpeptid-haltige Vorstufen ausgegangen und Signalpeptide waren auch bei Proteinen des Periplasmas und der äußeren Membran von E. coli gefunden worden. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob auch die Exoprotease als höhermolekulares Vorläuferprotein synthetisiert und exportiert wird. Nach Gewinnung von Protease-spezifischem Antiserum sollte die Protease bzw. ihre eventuell inaktive(n) Proform(en) in den verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Hierzu wurde geplant, wenn nötig, Bedingungen zu suchen, z.B. durch Einsatz von Hemmstoffen, um solche Proformen anzureichern und zu charakterisieren. Die Isolierung und Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde ebenfalls zur Identifizierung einer Vorstufe in Betracht gezogen. Da die Studien über die Exoproteasebiosynthese in vivo durchgeführt wurden, sollten sie generell einen Beitrag zur Proteinsekretion bei Prokaryonten liefern. Darüber hinaus wurde durch die Arbeit mit Serratia marcescens die Möglichkeit eröffnet, Sekretionsmechanismen auch innerhalb der Gram-negativen Bakterien zu vergleichen, da ansonsten fast ausschließlich E. coli als Untersuchungsobjekt dient. Der wohl interessanteste Aspekt der Arbeit über die Exoproteasesekretion ist der Export eines Proteins durch zwei Membranen. Dies sollte zusätzliche Informationen über die Proteinexkretion liefern und eine Verbindung zu den in eukaryontischen Zellen vorliegenden Verhältnissen herstellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck.

Amersham:	L-^{35}S-Cystein (975 Ci/mmol) L-^{35}S-Methionin (1230 Ci/mmol) L-^{14}C-Aminosäuren
Beckman:	Eichstandard zur Aminosäureanalyse
Beecham-Wülfing:	Eunova (Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente)
Behring:	Freundsches Adjuvans, komplett
Boehringer:	Carboxypeptidase A und B Humantransferrin Lysozym Rifoampicin
Buchs:	Ammoniumsulfamat
Difco:	Bacto-Agar Bacto-Trypton Yeast-Extrakt
Miles:	V8-Protease (aus Staphylococcus aureus)
NEM:	En^{3}Hance Enlighting
Kodak:	Entwickler für Röntgenfilme Fixierer für Röntgenfilme Röntgenfilm xOmat RxR5
Pharmacia:	Protein A-Sepharose CL 4B
Serva:	Acrylamid Bisacrylamid Bromphenolblau Chloramphenicol

Serva:	Coomassie Brilliant Blue G250
	Desoxyribonuclease I
	Fluram
	Mercaptoäthanol
	1,10-Phenanthrolin
	Phenäthylalkohol
	Procain
	SDS
	TLCK
	TMED
	Triton X 100
	Visking-Dialysierschlauch
Sigma:	Azocasein
	N-Ethylmorpholine
	Rinderserumalbumin
Whatman:	DE-52-Cellulose (preswollen)

2.2 Nährmedien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium , angesetzt mit deionisiertem Wasser.

TY-Medium

Bacto Tryptone	10	g
Yeast Extract	5	g
NaCl	5	g

TY-Agar

Wie TY-Medium, jedoch zusätzlich 15 g Bacto Agar

Glycerolbasalmedium (GBM) (82)

Di-Ammoniumcitrat	1,25	g
KH_2PO_4	0,75	g
Na_2CO_3	0,75	g
NaCl	0,5	g
$MgSO_4$ [1]	0,25	g
Glycerin [2]	15,8	g

mit 6 N HCl auf pH 6,6 einstellen.
1: 10 ml 0,1 M $MgSO_4$, einzeln autoklaviert.
2: 31,6 ml 50 % Glycerin, einzeln autoklaviert.

Aminosäure-Glycerolbasalmedium (AS-GBM)

Aminosäurelösungen (AS-Lösungen):

A) 1 mg/ml der 20 l-Aminosäuren, in Aqua bidest., autoklaviert und eingefroren (5 ml Portionen).
B) wie A), jedoch 2 mg/ml Cystein.
C) wie A), jedoch ohne Cystein.

Multibionta-Lösung

1 Multibiontadrageé (Eunova) wurde, nach Abwaschen der Zuckerhülle, in 10 ml Aqua bidest. gelöst und sterilfiltriert.

AS-GBM

Wie GBM, jedoch zusätzlich 20 ml AS-Lösung B) und 5 ml Multibionta-Lösung.

AS-GBM ohne Cys oder ohne Cys + Met

Wie GBM, jedoch zusätzlich 20 ml AS-Lösung C) oder D) und 5 ml Multibionta-Lösung.

2.3 Bakterienstämme

Serratia marcescens ATCC 25419 stammt aus dem Darm des Baumwollkapselkäfers (88) und wurde als der Exoprotease-produzierende Wildtyp in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben, als Teststamm benutzt.
Serratia marcescens DSM 30122, Weihenstephan 10207, Exoproteaseproduzent, wurde aus pasteurisierter Milch isoliert.
Serratia marcescens W 831, ein Protease-defizienter Stamm des Wildtyps S. marcescens WT 225, wurde von Prof. Winkler, Bochum, erhalten.
Serratia marcescens EN 6, eine Cysteinmangelmutante von S. marcescens ATCC 25419, stammt aus der Sammlung des Lehrstuhls.

2.4 Kulturbedingungen

Zur Anzucht von Vor- oder Hauptkulturen dienten Bakterienstämme, die auf TY-Agarplatten 48 Std. bei 30°C unter aeroben Bedingungen gewachsen

waren und bei 4°C gelagert wurden. Die Züchtung der Zellen in Flüssigkulturen (10 - 500 ml) erfolgte bei 30°C, unter aeroben Bedingungen, im Wasserbadschüttler (Gyrotory Watherbath-Shaker Model G75, New Brunswick Scientific), Stufe 4,5 - 5. Es wurden Erlenmeyerkolben (100 - 1.000 ml) mit einer Schikane und Wattestopfen benutzt.
Die Zelldichte wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm im Eppendorfphotometer (1101 M) bestimmt.

2.4.1 Zucht des Wildtyps in TY-Medium

Zellen von S. marcescens ATCC 25419 wurden, wenn nicht anders angegeben, in TY-Medium unter den oben aufgeführten Bedingungen gezüchtet. Die Kulturen, deren Überstand zur Isolierung von Protease I und II benutzt wurde, wurden in 2 l Kolben im 27°C Brutraum geschüttelt (Controlled Environment Incubator-Shaker, New Brunswick Scientific).

2.4.2 Zucht der Cysteinmangelmutante in AS-GBM (Cysteinmangelbedingungen)

Eine in 20 Aminosäure-haltigem Glycerolbasalmedium (AS-GBM) gezüchtete Übernachtkultur von S. marcescens EN 6 wurde im gleichen Medium auf eine Zelldichte von 2 - 3 x 10^8 Zellen/ml verdünnt und bei 30°C geschüttelt (ab 5.00 Uhr morgens, vorher im Eisbad). Bei Erreichen einer optischen Dichte von OD_{578} = 3 - 4 (Ende der logarithmischen Phase) wurde die Kultur (meist 20 ml) bei Raumtemperatur abzentrifugiert (12.000 xg), die Zellen einmal in GBM (ohne Zusatz, 20 ml) gewaschen, in der ursprünglichen Zelldichte (3 - 4 x 10^9 Zellen/ml) in Cystein oder Cystein und Methionin-freiem AS-GBM (AS-GBM ohne Cys; AS-GBM ohne Cys + Met) resuspendiert (meist 15 - 17 ml) und bei 30°C weiter inkubiert. Als Inkubation unter "Cysteinmangelbedingungen" wird im folgenden die Inkubation der Zellen in AS-GBM ohne Cys + Met, nach Vorzucht in AS-GBM (wie oben beschrieben) bezeichnet.

2.5 Gewinnung des Zellüberstandes

Zellüberstände bis zu 1,3 ml (hauptsächlich nach radioaktiver Markierung) wurden durch 5 - 10 Min. Zentrifugation bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge gewonnen. Volumina bis zu 5 ml wurden durch 10 - 30 Min. lange Se-

dimentation der Zellen in der Minifuge (Hereaus Christ) bei 5.000 xg/ 4°C erhalten. Größere Kulturvolumina wurden in der Sorvall-Zentrifuge 20 Min. lang bei 12.000 xg/4°C abzentrifugiert.

2.6. Zellaufschluß und Zellfraktionierung

2.6.1 Frenchpress-Aufschluß

Die Zellen von je 30 ml in TY-Medium gezüchteten Kulturen wurden 3mal mit 20 ml kaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 gewaschen und in 5 ml des gleichen Puffers resuspendiert, in Eis gekühlt und bei 16.000 psi in "French pressure cell press" (Aminco) aufgeschlossen. Unaufgeschlossene Zellen wurden sedimentiert (12.000 xg, 4°C), in 3 ml Puffer aufgenommen und ein zweites Mal aufgeschlossen. Nach Verwerfung der restlichen ganzen Zellen wurden beide Frenchpress-Lysate vereinigt und bei -20°C aufbewahrt.

Bei Test der Proteaseaktivität wurden je 0,3 ml des Frenchpress-Lysates und 0,3 ml der Ausgangskultur unverdünnt im Azocaseintest 1 Std. inkubiert.

Bei dem in 3.6 beschriebenen Versuch (Immunfällung aus Frenchpress-Lysaten) wurden je 500 µg der Lysate 15 Min. in der Eppendorfzentrifuge (4°C) abzentrifugiert (um unlösliche Teile zu entfernen) und je 500 µg der Lysate in Membranlösungspuffer (1 % SDS, 10 % Glycerol in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7, Endkonz.) 5 Min. gekocht. Die Proben wurden mit doppeltem Volumen an 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7,5 verdünnt und nach 2.11.3.1 immungefällt.

2.6.2 Aufschluß durch Kochen in SDS

Der Zellaufschluß durch Kochen in SDS wurde in den meisten radioaktiven Versuchen durchgeführt und erfolgte im wesentlichen nach einer von Beckwith beschriebenen Methode (108).

2.6.2.1 Gewinnung von Zellextrakten

a) Die Kultur wurde (nach Stop der Markierung durch zerstoßenes Eis) 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C abzentrifugiert, der Zellüberstand bis zur weiteren Verwendung (Immunfällung) im Eisbad aufbewahrt und die Zellen wie folgt weiterbehandelt: Das Zellpellet wurde

3mal mit 1 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 gewaschen (wenn nicht anders angegeben) und dann in 50 - 75 µl SDS-Extraktionspuffer, der 10 mM Tris/HCl pH 8, 1 % SDS und 1 mM EDTA enthielt, 5 Min. gekocht (95°C, Heizblock). Die Zellysate wurden mit 1,3 ml 2 % Triton X-100, 150 mM NaCl und 1 mM EDTA-haltigem 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 verdünnt und mindestens 3 x 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, um alle sedimentierbaren Teile zu entfernen, bevor die Immunfällung, nach 2.11.3.2, durchgeführt wurde.
b) Ein besserer Zellaufschluß (jeweils angegeben) wurde erzielt, wenn die sedimentierten Zellen in 0,5 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 aufgenommen wurden und sofort mit 0,5 ml 20 % eiskalter TCA, wie in 2.6.2.2 angegeben, gefällt wurden, bevor das Kochen in SDS erfolgte.

2.6.2.2 Gewinnung von Kulturextrakten (67)

Radioaktiv markierte Kulturen wurden nach Zugabe des gleichen Volumens an 20 proz. eiskalter Trichloressigsäure (TCA) gut gemischt (Vortexmixer) und anschließend 15 Min. im Eisbad inkubiert. Das TCA-gefällte Material wurde 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge (4°C) abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit 1 ml Aceton (eiskalt) wie in 2.6.2.1 angegeben mit SDS gekocht und weiterbehandelt.

2.6.3 EDTA/Lysozym-Aufschluß (34)

^{35}S-Methionin-markierte Zellen (s. 3.8.2)

10 ml der S. marcescens EN 6-Kultur mit 4,3 x 10^8 Zellen/ml wurden nach 1 Std. ^{35}S-Methionin-Markierung (1 µCi/ml) sedimentiert (5.000 xg, 4°C) und nach zweimaligem Waschen in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 in 2 ml des gleichen Puffers, der 5 mM EDTA und 0,5 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Die Lösung (in einem verschließbaren Glaszentrifugenröhrchen) wurde in einem Eis/Aceton-Bad eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Vorgang wurde 2mal wiederholt, die Probe dann mit 5 ml 20 µg/ml DNase- und 20 mM $MgCl_2$-haltigem Tris/HCl-Puffer (10 mM pH 8) verdünnt und 30 Min. im Eisbad inkubiert. Ganze Zellen wurden nach Zentrifugation bei 5.000 xg verworfen und das Zellysat (Überstand) 1 Std. bei 35.000 xg zentrifugiert. Die lösliche Fraktion (Pellet) in 5 ml Tris/HCl-Puffer einmal gewaschen (35.000 xg, 1 Std.) und dann in 100 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Nach Bestimmung des Proteingehaltes (mit Fluram, 2.8.2) wurden 500 µg der Membranfraktion in Membranlösungspuffer, 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7, 1 % SDS, 10 % Glycerin (Endkonz.) 5 Min. gekocht und anschließend eine Immunfällung nach 2.11.3.1 durchgeführt. Die Präzipitate von je 100 und 400 µg Ausgangsmaterial wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Von der löslichen Fraktion wurden 800 µg mit Antiserum inkubiert und die Präzipitate von 100 und 600 µg Ausgangsmaterial im Gel aufgetragen. Weiterhin wurden 100 µg der Membranfraktion und 1 mg der löslichen Fraktion, nach Äthanolfällung bei -20°C, mit Elektrophoresemix gekocht und direkt (25 - 100 µg) in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.6.4 Ultraschall-Aufschluß

1) Unmarkierte Zellen (s. 3.10.2)

Die Zellen von je 4 ml der in Anwesenheit von "Sekretionsinhibitoren" (20 mM Procain, 20 mM PEA, 5 mM TLCK, 1 mM TLCK) und bei 18°C oder 42°C gezüchteten (1 Std.) TY-kulturen wurden in 4 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5, der 10 µg/ml DNase und die oben angegebenen Konzentrationen an "Sekretionsinhibitoren" enthielt, aufgenommen und je 2 ml davon 4 x 30 Sek. mit je 30 Sek. Kühlpause im Eisbad beschallt (Branson Sonifier). 0,3 ml der Ultraschall-Lysate wurde nach Sedimentation der ganzen Zellen (Eppendorf-Zentrifuge, 4°C), 60 Min. lang auf Proteaseaktivität im Standardenzymtest (2.8) geprüft.

2) Radioaktiv markierte Zellen (s. 3.11.5)

Markierte Zellen ($2,7 \times 10^9$) wurden in 2,5 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5, der 10 µg/ml DNase, 10 mM Orthopheanthrolin und je die Konzentration an "Proformanreicherungssubstanzen" (30 mM Procain, 20 mM PEA, 5 mM TLCK und 1 mM EDTA) enthielt, in deren Anwesenheit die Kulturen markiert worden waren, aufgenommen und 6 x 15 Sek. mit je 15 Sek. Kühlpause im Eisbad beschallt. Restliche ganze Zellen wurden nach Zentrifugation (5.000 xg, 4°C) verworfen und die Lysate mit den jeweiligen oben angegebenen Puffern auf 5 ml aufgefüllt. Die Zellysate wurden nach Zugabe von 0,8 ml eines Frenchpress-Lysates unmarkierter Zellen (als Membrancarrier) 1 Std. bei 100.000 xg in einer Beckman Ultrazentrifuge (75 Ti-Rotor) zentrifugiert. Die Überstände (lösliche Fraktionen) wurden im Eisbad aufbewahrt und die Sedimente (Membranfraktionen) in 5 ml 2 % Triton X-100

und 5 mM $MgCl_2$-haltigem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Proteine der inneren Membran herauszulösen (113). Danach wurden die äußeren Membranen durch Zentrifugation bei 100.000 xg gewonnen. Die löslichen Fraktionen (1. UZ-Überstand), die Proteinfraktionen der inneren Membranen (Triton X-100-lösliche Fraktion, 2. UZ-Überstand) und die Proteinfraktionen der äußeren Membranen, die durch Kochen in 1 % SDS (75 µl) wie in 2.6.2.1 für Zellen beschrieben gewonnen wurden, wurden einer Immunfällung (2.11.3.2) unterzogen.

2.7 Test der Proteaseaktivität

Die enzymatische Aktivität wurde mit Azocasein als Substrat getestet (118). Die Hydrolyse des Azocaseins erfolgte bei 30°C in einem Reaktionsgemisch, das 0,3 ml Enzymprobe, 0,1 ml 1 M Tris/HCl-Puffer pH 8, 0,1 ml Aqua dest. und 0,5 ml 2 % Azocasein (in Aqua dest.) enthielt. Nach 10 oder 60 Min. wurde die Reaktion durch Zufügung von 2 ml kalter 7 proz. Perchlorsäure gestoppt und die Proben 10 Min. bei 4°C abzentrifugiert (5.000 xg). 2 ml des Überstandes wurden durch Zugabe von 0,3 ml 10 N NaOH alkalisiert und danach die optische Dichte bei 436 nm gemessen. Bei den Leerwerten wurde Perchlorsäure vor Azocasein zugefügt. Die Probenverdünnung richtete sich, wie die Inkubationszeit, nach der zu erwartenden Aktivität und lag beim WT-Überstand bei 1:10 (10 Min.). Proben, die unverdünnt eingesetzt nach 60 Min. Inkubation keine sichtbare OD_{436}-Differenz zur Kontrolle zeigten, wurden als inaktiv angesehen.
Wurden Substanzen auf Proteaseinhibition getestet, dann wurden diese anstelle der 0,1 ml Aqua dest. in 10-facher Konzentration eingesetzt und als Enzymprobe 1:10 verdünnter TY-Überstand benutzt. Der Test wurde nach 30 Min. Vorinkubation (30°C) wie oben beschrieben 10 und 60 Min. lang durchgeführt.
Die Proteaseeinheit (PU) wurde definiert als OD_{436}/Min./ml Enzymlösung. PU/mg entspricht der spezifischen Aktivität und PU/OD_{578} der Aktivität pro Zellzahl. Die Sekretionsrate, Δ PU/Std./OD_{578} wurde als Aktivitätszunahme innerhalb 1 Std. pro Gesamtzellzahl definiert.

2.8 Proteinbestimmung

2.8.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration wurde im allgemeinen nach einer modifizierten Methode von Lowry (83) bestimmt. Folgende Vorratslösungen wurden angesetzt: Lösung A enthielt 2 g K-Na-Tatrat und 100 g Na_2CO_3 in 500 ml 1 N NaOH und wurde auf 1 l Aqua dest. aufgefüllt. Lösung B enthielt 2 g K-Na-Tatrat, 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O, 90 ml Aqua dest. und 10 ml 1 N NaOH. Lösung C wurde immer frisch angesetzt und bestand aus 1 Vol. Teil Folin Ciocalteus und 15 Vol. Teilen Aqua dest.. Die auf 1 ml mit Aqua dest. aufgefüllten Protein-haltigen Proben wurden mit 0,9 ml Lösung A 10 Min. bei 50°C (Wasserbad) inkubiert. Nach Abkühlung im kalten Wasserbad (25°C) wurde 0,1 ml Lösung B zugegeben und 10 bis 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3 ml Lösung C unter kräftigem Schütteln (Vortexmixer) zugefügt. Nach Abkühlung im kalten Wasserbad wurde die Extinktion bei 578 nm gemessen. Zur Aufstellung einer Eichkurve diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0 - 0,1 mg/ml.

2.8.2 Proteinbestimmung mit Fluram

Die Proteinkonzentrationen von Lösungen, die in nur geringer Menge vorlagen oder deren Proteingehalt gering war, wurde fluorimetrisch mit Fluram gemessen. 1,5 ml der Proteinlösung, in 0,5 M Borat-Puffer pH 9, wurde unter kräftigem Schütteln auf dem Vortexmixer mit 0,5 ml einer Fluramlösung, mit 30 mg Fluram/100 ml Dioxan, gemischt. Die Fluorescens wurde in einem Eppendorf-Photometer 1101 M mit Fluorescens-Zusatz 1030 gemessen. Für die geforderte Anregungswellenlänge von 390 nm wurde das Filter 405 - 436 nm, für die emittierte Strahlung von 475 - 490 nm das Filter 470 - 3.000 nm eingesetzt. Die Eichung erfolgte mit 1 - 80 µg Rinderserumalbumin.

2.9 Test der Aminosäurezusammensetzung

2.9.1 Aminosäureanalyse

0,5 bis 1 mg der isolierten Proteasen, in 3 ml destillierter Salzsäure (5,7 N) wurden in Hydrolyseröhrchen unter Stickstoff (2 Min., zur Verhinderung der oxidativen Zerstörung der Aminosäuren) eingeschmolzen. Die Hy-

drolyse erfolgte bei 110°C und wurde nach 19 Std. durch Eindampfen des Hydrolysates beendet. Der Vorgang wurde mit Aqua bidest. 2mal wiederholt und der Rückstand (hydrolysierte Aminosäuren) in 0,2 N Natriumcitrat-Puffer pH 2 aufgenommen.
Die Aminosäuren wurden im Einsäulenverfahren mit dem Aminosäureanalysator LC 6005 (Biotronik), nach dem Programm für Proteinhydrolysate, quantitativ bestimmt. Die Berechnung des Aminosäuregehaltes (Nanomole) erfolgte mit Hilfe eines angeschlossenen Rechners (System I Computing Integrator, Spectra Physics) und der Vergleichsanalysen eines Standardaminosäuregemisches (10 nMol/Aminosäure).

2.9.2 Perameisensäure-Oxidation (56)

Zur Bestimmung des Methionin- und Cystein-Gehaltes der Protease wurde diese vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert (Umwandlung von Cystein in stabile Cysteinsäure und von Methionin in sein stabiles Sulfonderivat). Lösung I, die 0,5 ml 30 % Peroxyd und 9,5 ml Ameisensäure enthielt, wurde nach 2 Std. Inkubation bei Raumtemperatur ins Eisbad gestellt. Die Lösung II, die 1 mg Protease (Lyophilisat) in 0,5 ml Ameisensäure enthielt (das Protein war nicht vollständig gelöst), wurde nach 30 Min. Inkubation (in einem 500 ml Rundkolben) bei -5°C (Eis + NaCl) mit der Lösung I versetzt. Nach 150 Min. Inkubation bei -5°C wurde die Säure im Eisbad abrotiert und die Verdampfung mehrmals mit zugegebenem Aqua bidest. wiederholt. Die einrotierte Probe wurde in 3 ml 6 N HCl aufgenommen, wie oben beschrieben hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Dem Vergleichsaminosäuregemisch wurde vorher oxidiertes Methionin und Cystein (je 10 nMol) zugegeben.

2.9.3 Bromcyanspaltung

Im wesentlichen wurde nach der von Hantke (50) beschriebenen Methode vorgegangen. 0,6 mg Exoprotease wurden in einem Schliffkolben mit 0,25 ml Ameisensäure (80 proz.) versetzt (das Protein löste sich nicht vollständig) und 0,65 mg Bromcyan zugegeben. Nach 20 Std. Inkubation bei Raumtemperatur (unter dem Abzug) wurde die Spaltung durch Zugabe von 6 ml Aqua bidest. gestoppt. Die Probe wurde lyophilisiert, im Elektrophoresemix 5 Min. gekocht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wur-

de die Protease wie oben behandelt, aber kein Bromcyan zugegeben. Da keine vollständige Spaltung erzielt worden war, wurde außerdem eine Bromcyanspaltung wie oben, aber in Anwesenheit von 0,2 M Mercaptoessigsäure (als Reduktionsmittel) durchgeführt, um eine Oxidation der Schwefelgruppen zu verhindern.

2.10 Gelelektrophorese

2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden, nach dem Gelsystem von Lugtenberg (84), Slab-Gele von 1,5 mm oder 3 mm Dicke und 12 cm Länge angefertigt. Das Trenngel enthielt 11 % Acrylamid, 0,075 % Bisacrylamid (Verhältnis 40:0,3), 0,2 % SDS und 0,02 % Ammoniumpersulfat in 0,375 Tris/HCl-Puffer pH 8,8. Nach mehrmaliger Entlüftung wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,02 % TEMED gestartet, die Lösung zwischen die Glasplatten der Gelapparatur (SE 500 Hoefer Scientific Instruments) gegossen und mit Isobutanol (zur Erzeugung einer glatten Oberfläche) überschichtet. Es wurden auch Trenngele mit 0,125 % (Verhältnis 40:0,5) oder 0,2 % (Verhältnis 40:0,8) anstelle 0,075 % Bisacrylamid verwendet. Nach der Polymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und das Sammelgel, das 3 % Acrylamid, 0,08 % Bisacrylamid, 0,1 % SDS, 0,02 % Ammoniumsulfat und 0,02 % TEMED in 0,125 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8 enthielt, eingefüllt. Die Entlüftung erfolgte wie oben. Die Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur oder bis zu 3 Tagen bei 4°C aufbewahrt. Um ihre Austrocknung zu verhindern, wurde die obere Pufferkammer mit Aqua bidest. gefüllt (kein Gelkontakt) und der Gelbehälter über die Apparatur gestülpt.
Die Proben wurden in Elektrophoresemix, der 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoäthanol und 0,001 % Bromphenolblau in 62,5 mM Tris/HCl-Puffer pH 6,8 enthielt, 5 Min. gekocht (95°C Heizblock) und danach aufgetragen. Dieser Elektrophoresemix und der gleiche, aber doppelt konzentriert (für in Lösung befindliche Proben) wurde bei -20°C gelagert. Immunpräzipitate wurden im Elektrophoresemix, der kein Mercaptoäthanol enthielt, aufgetragen.
Die Elektrophorese wurde unter Verwendung eines 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS-haltigem 0,025 M Tris/HCl-Puffers pH 8 bei Raumtemperatur oder unter Kühlung mit Leitungswasser (Gele mit 3 mm Dicke) mit konstanter Strom-

stärke (12,5 mA/1,5 mm dickes Gel) durchgeführt. Wenn die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Proteine 2 Std. mit Coomassie Brilliant Blau, in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure, gefärbt. Anschließend wurde mit einer 7,5 % Essigsäure- und 5 % Methanol-haltigen Lösung, die mehrmals erneuert wurde, entfärbt.
Als Eichproteine dienten Humantransferrin (78.000 Dalton), Rinderserumalbumin (67.000 Dalton), Exoprotease (51.000 Dalton), Ovalbumin (43.000 Dalton), Chymotrypsinogen (25.000 Dalton), Myoglobin (17.200 Dalton) und Cytochrom C (12.400 Dalton). Bei radioaktiven Gelen wurden die Eichproteinbanden auf dem getrockneten Gel mit ^{14}C-haltiger Tusche markiert.

2.10.2 Autoradiographie

SDS-Polyacrylamidgele (gefärbt und entfärbt) wurden unter dem Abzug 1 - 2 Std. in En^{3}Hance und anschließend 1 Std. in Aqua bidest., um den wasserunlöslichen Scintillator im Gel auszufällen, inkubiert. Das aktivierte Gel wurde dann auf Filterpapier (Whatman-3) getrocknet und zusammen mit dem zuvor mit einem Blitz belichteten Röntgenfilm (Kodak X-omat R x R5) in einer Röntgenfilmkassette bei -70°C exponiert. Die Exponierzeit, in Tagen (T) oder Wochen (Wo), ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Einige Gele wurden mit Enlightning 30 Min. inkubiert, anschließend getrocknet und wie oben weiterbehandelt. Die Aktivierung ist vergleichbar mit der durch En^{3}Hance, die Prozedur angenehmer, da schneller und geruchlos, hat aber den Nachteil, daß die Gelbanden in einer 2. Elektrophorese (wie in 2.10.3) weniger gut aufgetrennt werden als nach En^{3}Hance-Behandlung.

2.10.3 Partielle Proteolyse im SDS-Polyacrylamidgel

Es wurde im wesentlichen nach der Methode von Cleveland et al. (24) vorgegangen. Die Testproteine wurden in einer ersten 11 % SDS-PAGE, wie in 2.10.1 beschrieben, aufgetrennt. Die Banden wurden nach Färben und Trocknen des Gels, bei radioaktiven Proben anhand des Autoradiogramms, mit einem Skalpell herausgeschnitten und das Papier entfernt. Dann wurden sie in die Taschen eines zweiten SDS-Polyacrylamidgels (1,5 mm dick), das 15 % Acrylamid und 0,2 % Bisacrylamid im Trenngel enthielt und ein verlängertes Sammelgel (3 cm) besaß, mit Hilfe eines Spatels bis zum Taschenboden

eingeführt. Mit Probenauftragspuffer, 1 mM EDTA und 0,1 % SDS in 0,125 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8 wurden die Taschen so weit aufgefüllt, daß die Banden bedeckt waren. Nachdem alle Luftblasen entfernt waren, wurden 5 µl 20 % Glycerin-haltiger Probenauftragspuffer und 5 µl der verschiedenen Konzentrationen der Staphylococcus V8-Protease oder der S. marcescens Protease I, in 10 % Glycerin-haltigem Probenauftragspuffer, zugegeben (Konzentrationen wie in Abb. 3). Die Elektrophorese lief wie in 2.4.10 (RT), außer daß kurz bevor die Coomassie Brilliant Blau-Bande das Trenngel erreicht hatte, der Strom 30 Min. abgestellt wurde (Proteolyse). Nach der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt, getrocknet und gegebenenfalls einer Autoradiographie unterzogen. Die vorherige Aktivierung radioaktiver Gele mit En^{3}Hance störte die Elektrophorese und proteolytische Spaltung nicht. Vorbehandlung mit Enlightning beeinträchtigte die Elektrophorese, was zu einer schlechteren Trennung der Spaltprodukte führte.

2.11 Gewinnung und Test des Anti-Exoprotease-Serums

2.11.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Zur Immunisierung eines Kaninchens wurden 25 mg Exoprotease, nach dem schon früher durchgeführten Reinigungsschema (17) über Gelfiltration (Biogel P100) und Anionenaustauschchromatographie (DEAE-Cellulose) isoliert. Die Reinheit des Proteins wurde durch Aminosäureanalyse und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestätigt.
Jeweils 2 mg der gereinigten Exoprotease (Protease I) wurden in 0,5 ml 0,9 % NaCl-haltigem 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml kompletten Freundschen Adjuvans so lange mit Ultraschall (je 15 Sek.) behandelt, bis die Probe weiß, homogen und relativ fest war. Fünfmal wurden im Abstand von 3 - 4 Wochen 2 mg Exoprotease einem Kaninchen subkutan gespritzt. Nach der Zweitimmunisierung wurde je 12 Tage nach der Immunisierung Blut aus der Ohrvene entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut 24 Std. bei 4°C aufbewahrt und der Blutkuchen danach 30 Min. bei 4.000 xg abzentrifugiert. Das Serum wurde bei -70°C in 0,5 ml Portionen gelagert. Insgesamt wurden 60 ml Antiserum gewonnen.

2.11.2 Doppel-Diffusion nach Ouchterlony (147)

Petrischalen mit 5 cm Durchmesser wurden mit 5 ml flüssiger Agarose (0,8 % in 0,025 M 5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz (Veronal)/HCl-Puffer pH 8,6) gefüllt und nach Erstarren der Agarose in diese mit Hilfe einer Schablone und einer Pasteurpipette Löcher gestanzt. In diese Depots wurden 20 - 40 µl Antiserum und Antigen unverdünnt, oder nach Verdünnung mit Saline (0,9 % NaCl-Lösung) oder 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 eingefüllt und bei 4°C inkubiert. Nach 1 - 5 Tagen wurden der Antigen- oder Antikörpergehalt anhand der Ausbildung von Präzipitationslinien geprüft.

2.11.3 Immunfällung

Bei Volumina bis 1,3 ml wurde die Immunfällung in Eppendorfgefäßen, bei höheren Volumina in spitzen Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Der pH der Proben wurde, falls er nicht zwischen 7 und 8 lag, auf pH 8 mit Tris/HCl-Puffer (10 mM Endkonz.) eingestellt.

2.11.3.1 Immunfällung ohne Protein A/Sepharose-Behandlung

Die Immunfällung ohne Protein A/Sepharose-Behandlung wurde in den meisten Fällen mit Protease-haltigem Zellüberstand durchgeführt. Bei den Versuchen, bei denen diese Art der Fällung auch aus Zellextrakten erfolgte (s. 3.6 und 3.7.2) wird die Probenvorbereitung und die eingesetzte Menge extra angegeben.
0,5 bis 2 ml Protease-haltiger Überstand wurde mit 50 - 75 µl Antiserum bei 4°C über Nacht gefällt. Das Immunpräzipitat wurde 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge oder 10 Min. in der Minifuge (5.000 xg) abzentrifugiert und anschließend 2mal mit 1 ml 0,15 M NaCl-haltiger 0,05 % SDS-Lösung oder 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen. Das Sediment wurde in 20 - 50 µl Probenmix für die SDS-PAGE 5 Min. gekocht. Der Elektrophoresemix enthielt kein Mercaptoäthanol, um die Spaltung des Antikörpers in, in der SDS-PAGE im Proteasebereich laufende Proteine, zu verhindern. Antikörperspaltprodukte traten dennoch, zumindest teilweise, auf, wenn die Probe nicht direkt, sondern nach Einfrieren aufgetragen wurde und bei Antiserum, das länger als 1,5 Jahre bei -70°C gelagert worden war.

2.11.3.2 Immunfällung mit Protein A/Sepharose-Behandlung (Immunfällung von Proben mit geringem oder unbekanntem Antigengehalt)

Bei den Experimenten (radioaktive Markierung), bei denen Kulturextrakte und Zellextrakte (2.6.2), lösliche Fraktionen und Membranfranktionen (2.5.3, 2.6.4) und der dabei anfallende Zellüberstand auf Antigengehalt geprüft wurde, und hierbei kein oder geringer Proteasegehalt zu erwarten war, wurden, wenn nicht anders angegeben, die Proben wie oben mit 25 - 50 µl Antiserum inkubiert und anschließend mit 30 - 50 µl Protein A/Sepharose 1 Std. bei 4°C geschüttelt. Die Protein A/Sepharose wurde wie folgt zubereitet (146): 100 mg Protein A/Sepharose (Trockengewicht) wurden in 1 ml 0,05 % NaN_3-haltigem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln suspendiert. Die eingesetzte Protein A-Menge (30 µl = 21 µg) sollte genügen, um die gesamte eingesetzte Antikörper-Menge zu binden (Protein A, eine Zelloberflächenkomponente von S. aureus, interagiert mit den Fc-Fragmenten der IgG-Moleküle). Der Protein A/Sepharose-Immunkomplex wurde 3 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge (RT) abzentrifugiert und 2mal mit 1 ml 0,3 M NaCl und 1 % Triton X-100 in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 und 1mal mit 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen. Der Niederschlag wurde mit 40 - 50 µl Elektrophoresemix ohne Mercaptoäthanol 5 Min. gekocht und die Sepharose 30 Sek. in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert, bevor die Probe (Überstand) in der SDS-PAGE getrennt wurde. Bei Volumina über 1,5 ml wie z.B. bei den löslichen Fraktionen (5 ml), wurde 50 - 60 µl Antiserum und 50 - 60 µl Protein A/Sepharose in einem Zentrifugenglas zugegeben und ansonsten wie oben vorgangen. Der Protein A/Sepharose-Immunkomplex wurde sukzessive in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert und wie oben mit Elektrophoresemix gekocht.

2.12 Isolierung der Protease I und II

2.12.1 Erste Isolierung der Protease II

1) Konzentrierung und Dialyse des Kulturüberstandes

2,12 l Kulturüberstand von S. marcescens ATCC 25419, nach 140 Std. Züchtung bei 27°C, wurden als Ausgangsmaterial benutzt. Die Gesamtprotease-

aktivität betrug 1221,1 PU, der Proteingehalt war 5,3 g. Der Überstand wurde in einer Druckzelle (Amicon, Modell 402, Membran PM 10) bei einem Druck von 1,5 Atm. auf 50 ml eingeengt. In der gleichen Druckzelle wurde gegen 3 l 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 dialysiert. Da im Dialysat trotz Kühlung (4°C) und trotz Zusatz von 0,02 % NaN_3 Zellen gewachsen waren, wurden diese 1 Std. bei 17.000 xg abzentrifugiert. Der dialysierte Überstand (41 ml), der 881,5 PU und 205 mg Protein enthielt, wurde eingefroren.

2) Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

Mit dem anionischen Ionenaustauscher DE52 (Diethylaminoethyl-Cellulose, preswollen), der mit 0,5 N HCl und 0,5 N NaOH, beide in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 vorbehandelt worden war, wurde eine Säule (2 x 23 cm) gefüllt. Die Säule wurde mit ca. 5 Säulenvolumen 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 äquilibriert. Die aufgetaute Probe wurde aufgetragen und bis Fraktion 25 mit obigem Puffer nachgewaschen. Bis Fraktion 32 wurde mit 0,05 M NaCl-haltigem $NaPO_4$-Puffer und anschließend mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0,05 M bis 0,1 M NaCl in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 (je 800 ml) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10,5 ml/Std., das Fraktionsvolumen 10,5 ml. Alle Fraktionen wurden nach Bestimmung der Proteaseaktivität eingefroren. Alle Schritte dieser und der folgenden Isolierungen wurden bei 4°C und in Anwesenheit von 0,02 % NaN_3 durchgeführt. Die benutzte Pumpe (Peristaltic Pump P-3) stammte von Pharmacia, der Fraktionssammler mit Detektor war LKB 8300 Uvicord II.

3) Rechromatographie der Protease II-Fraktionen mit DEAE-Cellulose

Die Fraktionen 80 - 110 des Protease II-Gipfels nach der ersten Säulenchromatographie (Identifizierung über Proteaseaktivität und SDS-PAGE) wurden in der Druckzelle (Amicon, Modell 52, Membran P 10) auf 17 ml eingeengt und gegen 300 ml 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 in der gleichen Zelle dialysiert. Die eingeengte und dialysierte Probe wurde auf eine neu gepackte (wie in 2)) DEAE-Cellulose-Säule (2 x 20 cm) aufgetragen. Es wurde mit 30 ml $NaPO_4$-Puffer pH 7 nachgewaschen und dann mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0,05 - 0,1 M NaCl in obigem Phosphatpuffer (je 800 ml) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 11 ml/Std., das Fraktionsvolumen war 11 ml. Die Fraktionen 63 - 85 des Protease II-Gipfels wurden vereinigt (254 ml), insgesamt 5mal gegen 10 l Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.12.2 Zweite Isolierung der Protease II

1) Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

Eine 2. Isolierung der Protease II wurde nach dem gleichen Prinzip, jedoch mit größerer Menge an Ausgangsmaterial durchgeführt. 11,55 l Kulturüberstand von Zellen, die 120 Std. in TY-Medium gezüchtet worden waren (2.4.1), mit insgesamt 12192 PU und 26,9 g Protein wurden wie oben (2.12.1) mit Hilfe der Ultrafiltration auf 74 ml eingeengt und anschließend im Dialyseschlauch gegen 2 l 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 (mit 10maligem Wechsel) dialysiert. Die Probe wurde auf eine, wie oben vorbereitete DEAE-Cellulose-Säule (2 x 30 cm) mit einer Laufgeschwindigkeit von 5 ml/Std. aufgetragen. Bis Fraktion 49 wurde mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7, von Fraktion 50 -74 mit 0,05 M NaCl-haltigem $NaPO_4$-Puffer und anschließend mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0,05 - 0,1 M NaCl in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 (je 800 ml) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std., das Fraktionsvolumen war 10 ml. Die Fraktionen wurden nach Messung der Enzymaktivität bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2) Rechromatographie der Protease II-Fraktionen mit DEAE-Cellulose

Die Fraktionen 90 - 110 des Protease II-Gipfels wurden nach Auftauen vereinigt (208 ml) und im Dialyseschlauch gegen 2 l 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 (mit 4maligem Wechsel) dialysiert. Die Probe wurde auf eine neu gepackte DEAE-Cellulose-Säule (2 x 20 cm) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit während des Probenauftrags 5 ml/Std., danach 11 ml/Std.). Bis Fraktion 71 wurde mit salzfreiem Puffer, bis Fraktion 116 mit 0,05 M NaCl-haltigem Puffer und danach mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0,05 - 0,1 M NaCl in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 eluiert. Die Fraktionen 150 - 185 enthielten Protease II. Da die Fraktionen 150 - 164 nach der SDS-PAGE noch Spuren von Protease I enthielten, wurden die Fraktionen 150 - 164 vereinigt und getrennt von den vereinigten Fraktionen 165 - 185 weiterbehandelt. Das Fraktionsgemisch 165 - 185 (220 ml) wurde in 2 Schläuchen gegen je 2 l Aqua dest. (mit 12maligem Wechsel) dialysiert und anschließend lyophilisiert (auf Einengen der Probe vor der Dialyse war wegen des dabei auftre-

tenden hohen Materialverlustes verzichtet worden). Das Fraktionsgemisch 150 - 164 (150 ml) wurde in 2 Dialysesäcken gegen je 2 l Aqua dest. (je 12maliger Wechsel) dialysiert. 2/3 des Dialysats wurden lyophilisiert und der Rest bei -20°C eingefroren.

2.12.3 Isolierung der Protease I

Es lagen 2 Protease II-Gipfel von der 1. und der 2. Protease II-Isolierung (jeweils 1. Säulenläufe) vor. Die Fraktionen 55 - 70 (111 ml) der 1. Isolierung und die Fraktionen 71 - 81 (145 ml) der 2. Isolierung wurden getrennt in Dialyseschläuchen gegen je 2 l 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 (je 5maliger Wechsel) dialysiert. Die Proben wurden ohne vorheriges Einengen auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 20 cm) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/Std. bis Fraktion 54 aufgetragen. Danach wurde bei einer Laufgeschwindigkeit von 11 ml/Std. mit 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 bis Fraktion 68, mit 0,04 M NaCl im Phosphatpuffer bis Fraktion 100 und anschließend mit 0,05 M NaCl im gleichen Puffer eluiert. Die Protease I-haltigen Fraktionen 125 - 150 wurden vereinigt (268 ml) und gegen je 2 l Aqua dest. (17maliger Wechsel) dialysiert. Die Hälfte des Materials wurde lyophilisiert, die andere Hälfte in 10 ml Portionen eingefroren.

2.13 Sequenzierung der Protease II und II

2.13.1 Sequenzierung mit Carboxypeptidase A und B

Die Durchführung der Spaltung erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Ambler (1).

1) Vorbereitung der Substrate

20 - 100 nMol (1 - 5,2 mg) der Protease I und II wurden in 1 ml 0,056 M (1,6 %) SDS-haltigem, flüchtigem 0,2 M N-Ethylmorpholinacetat-Puffer 30 Min. gekocht. Die Denaturierung war nötig, um die Exoproteasen zu inaktivieren (um die proteolytische Spaltung der Carboxypeptidasen zu verhindern) und da entfaltete Proteinketten von den Carboxypeptidasen leichter angegriffen werden. Kochen in SDS war die einzige Methode, die Pro-

teasen ohne Materialverlust gleichzeitig vollständig zu lösen und zu inaktivieren. Um das SDS wieder zu entfernen (um Störungen bei der Spaltung zu verhindern), wurden die Proben in einem Dialyseschlauch (10.000 D Porengröße) bei 4°C über Nacht gegen den obigen Puffer ohne SDS dialysiert. Gleichzeitig sollten hierbei noch vorhandene Spaltprodukte, die im Lyophilisat (Ausgangsmaterial) oder durch das Kochen auftraten, entfernt werden.

2) Vorbereitung der Enzyme

Die Carboxypeptidase B (CPB) lag als eingefrorene Lösung vor und konnte nach Auftauen ohne Vorbereitung eingesetzt werden.
Die Carboxypeptidase A (CPA) lag als Emulsion vor (4°C) und mußte wie folgt in Lösung gebracht werden: 25 µl (0,625 mg) der CPA wurden mit 1 ml Aqua bidest. gemischt und 5 Min. in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 0,1 ml 1 % (w/v) $NaHCO_3$ aufgenommen und im Eisbad weiterbehandelt. Tropfenweise wurde 0,1 N NaOH zugegeben bis die Lösung klar war (CPA gelöst). Durch tropfenweise Zugabe von 0,1 N HCl und Prüfung mit pH-Papier (Merck) wurde ein pH zwischen 8 und 9 eingestellt. Zuletzt wurde mit 0,2 M N-Ethylmorpholinacetat-Puffer pH 8,5 auf 0,625 ml aufgefüllt, so daß die Endkonzentration der CPA 1 mg/ml betrug. Die Lösung wurde im Eisbad aufbewahrt und immer frisch angesetzt.

3) Durchführung der Spaltung

Es wurden mehrere Spaltungen unter Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen und unterschiedlichen Enzym-Substratverhältnissen durchgeführt. Auch wurden die Inkubationszeiten und die Dialysebedingungen variiert. Nach dem folgenden Grundmuster wurde vorgegangen: Die dialysierten Proteasen I und II wurden mit 50 nMol Norleucin, als Kontrolle für den Grad der Dialyse, und mit CPA oder CPB (E:S = 1:125) versetzt, in einen Dialyseschlauch (3.500 D Porengröße) gefüllt und dieser in einen 50 ml Schliffkolben gesteckt. Die Dialyse der während der Spaltung bei 37°C freigesetzten Aminosäuren erfolgte gegen 20 ml Aqua bidest. oder 0,05 M N-Ethylmorpholinacetat-Puffer pH 8,5 unter Schütteln. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Dialysierflüssigkeit (mit den abgespaltenen Aminosäuren) gegen frische ausgetauscht und die Spaltung fortgeführt. In einer Variante wurde nach einer Spaltungsperiode das Dialysat entfernt und vor der Weiter-

inkubation frisches Enzym (CPA) zugegeben, um das Enzym-Substratverhältnis zu erhöhen. Die Dialyseflüssigkeiten wurden anfänglich einrotiert, später lyophilisiert (schneller, einfacher, kein Überkochen) und die Aminosäurezusammensetzung im Aminosäureanalysator wie in 2.9.1 bestimmt. Als Kontrolle diente immer eine Probe, die ohne Substrat (Proteasen), aber ansonsten wie die obigen Ansätze behandelt wurde (geringer Zerfall der Carboxypeptidasen während der Inkubation). Das Verhältnis der freigesetzten Nanomole der jeweiligen Aminosäuren von Probe und Kontrolle wurden bestimmt. Wenn dieses erhöht war, wurde der Gehalt der in der Kontrolle auftretenden Aminosäuren von dem der Proben abgezogen, um die tatsächlich freigesetzte Menge (nMol) der verschiedenen Aminosäuren zu erhalten. Da der Grad der Dialyse (bestimmt durch Freisetzung von N-Leucin) bei den eingesetzten Proben und Kontrollen ungefähr gleich war, wurde die Dialyse in die Berechnung nicht miteinbezogen.

2.13.2 Sequenzierung nach Edman

Der automatische Edman-Abbau wurde von Prof. Dr. K. Beyreuther, Universität Köln, in einem Beckman-Sequenzer, Modell 890 B, durchgeführt (4). Es wurden 3 Sequenzläufe mit Protease I (2 x 1 mg, 1 x 1,25 mg) und 4 Sequenzläufe mit Protease II, Fraktionsgemisch 165 - 185 aus der 2. Isolierung (2 x 1 mg, 2 x 1,25 mg) gefahren. Außer 2 Proben der Protease II (1 mg und 1,24 mg) wurden die Proteine vor dem Auftrag gegen je 1 l 5 % Ameisensäure in H_2O bei 5°C dialysiert, um freie Aminosäuren oder Proteasespaltprodukte zu entfernen. Hierbei wurde eine Eintrübung der Proben festgestellt. Die Phenylthiohydantion-Aminosäurederivate wurden nach Konvertierung mit Methanol/2 M HCl durch HPLC auf DuPont Zorbac CN-Säulen (4,5 x 250 nm) bestimmt.

2.14 "Export"-Experimente mit Protease I und II

2.14.1 Protease II-Freisetzungsexperiment

Serratia marcescens ATCC 25419 (Wildtyp) und Serratia marcescens W 831 (Proteasemangelmutant) wurden auf die gleiche Zelldichte in je 200 ml TY-Medium angeimpft und bis zu 150 Std. bei 30°C geschüttelt. In den in

Abb. 17 angegebenen Zeiten wurden je 20 ml der Kulturen steril abzentrifugiert (RT, 12.000 xg) und das Wildtyp-Zellpellet in dem Proteasemangelmutanten-Überstand weitere 24 Std. wie oben inkubiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (4°C, 12.000 xg) gewonnen und auf Proteaseaktivität im Azocaseintest und auf Protease II-Gehalt in der SDS-PAGE überprüft.

2.14.2 Inkubation der Protease I in Proteasemangelmutantenüberstand

0,1 mg der Protease I wurde in 1 ml Zellüberstand einer bis zur stationären Phase in TY-Medium gezüchteten Proteasemangelmutanten-Kultur, S. marcescens W 831, gelöst, sterilfiltriert, in 0,1 ml Portionen bei 30°C inkubiert und in den in Abb. 18 angegebenen Zeiten eingefroren. Nach Lyophilisation wurden die Proben in 30 µl Elektrophoresemix gekocht und 15 µl (5 µg Ausgangsmaterial) in der SDS-PAGE aufgetragen. Als Kontrolle wurde Mutantenüberstand ohne Protease wie oben behandelt.

2.14.3 Inkubation der Proteasen in Puffer

35 µg der Protease I und II, in je 50 mM Acetatpuffer pH 5, Tris/HCl-Puffer pH 7, 8, 9 und Glycerinpuffer pH 11 wurden in 5 µg (0,1 ml) Portionen bei 30°C inkubiert. Nach 48 Std. wurden die Proben nach Titration auf pH 7, mit Tris oder HCl (Test mit pH-Papier, Merck) oder direkt lyophilisiert und je 5 µg in der SDS-PAGE aufgetragen.
Die pH-Abhängigkeit der Protease I- und II-Aktivität wurde mit 0,1 ml der obigen Proben nach 0 Std. und 48 Std. Inkubation im Standardtest, der 0,1 ml Aqua dest. und 0,3 ml der jeweiligen 0,1 M Puffer enthielt und ansonsten wie in 2.7 durchgeführt wurde, getestet.

2.14.4 Inkubation der Proteasen bei 95°C

1) Inkubation ohne Orthophenanthrolin (OPA)

Je 10 µg der Protease I und II, in je 0,1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 oder in Aqua dest. gelöst, wurden 5 Min. und 30 Min. bei 95°C erhitzt (in vorgewärmten Eppendorfgefäßen, bei sukzessiver Zugabe der Proben),

lyphilisiert, in Elektrophoresemix gekocht und die gesamte Menge in einer SDS-PAGE aufgetragen.

2) Inkubation mit OPA

Je 80 µg der Protease I und II, in 0,84 ml Aqua dest. wurden mit 80 µl 0,1 M OPA (in MeOH gelöst) versetzt (9,5 mM OPA bzw. 1 µMol OPA/0,2 nMol (10 µg) Protease) und bei 95°C inkubiert. Nach den in Abb. 20 angegebenen Zeiten wurden die Proben eingefroren, lyophilisiert, in Elektrophoresemix gekocht und je 5 µg der Ausgangskonzentration in der SDS-PAGE getrennt.

2.15 Wachstums- und Proteaseaktivitäts-Messungen bei 18°C und 42°C und in Anwesenheit von "Sekretionsinhibitoren"

Zellen von S. marcescens ATCC 25419 wurden bis zu einer Zelldichte von 2 - 3 x 10^9 Zellen/ml in TY-Medium bei 30°C gezüchtet und dann Aliquots (ca. 30 ml) der Kultur entweder bei 18°C und 42°C oder nach Zugabe von verschiedenen in den einzelnen Abbildungen angegebenen Konzentrationen der "Sekretionsinhibitoren" Procain, Phenäthylalkohol (PEA), Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Tosyl-lysyl-chlor-methyl-keton (TLCK), Rifampicin und Natriumazid (NaN_3) bis zu 20 Std. weiterinkubiert. PEA und Rifampicin wurden in Methanol (10 %), alle anderen Substanzen in Aqua dest. gelöst und vor Einsatz sterilfiltriert (Membranfilter Schleicher und Schüll, BA 83). Nach verschiedenen Zeiten (aus den Abb. zu entnehmen) wurden 4 ml der Kulturen steril entnommen, die Zelldichte bestimmt, die Zellen sedimentiert (und eingefroren) und die Proteaseaktivität der Überstände im Standardtest gemessen.

2.16 Radioaktive Markierung

2.16.1 Messung des radioaktiven Einbaus

1) ^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein

Zur Bestimmung der Aufnahme und des Einbaus von ^{35}S-Methionin und ^{35}S-Cystein in Proteine wurden 0,5 - 1 ml der markierten Kultur in ein im Eis/NaCl-Bad vorgekühltes Zentrifugenröhrchen gefüllt und sofort 2 x 50 µl der Kultur abgefüllt (Bestimmung der Gesamtaktivität) und 2 x 50 µl mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt (s.u.). Die restliche Kultur wurde bei 4°C 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert

und der Zellüberstand wie die Gesamtkultur behandelt (2 x 50 µl abgefüllt, 2 x 50 µl TCA-gefällt). Die TCA-Fällung verlief wie folgt: 50 µl der radioaktiven Probe wurde auf ein Glas-Microfiber-Filter (GF-F Whatman) pipettiert und in die Kerbe eines Teflonkorbes gesteckt. Dieser wurde 10 Min. in eisgekühlter 10 proz. TCA inkubiert unter gelegentlichem Auf- und Abbewegen. Der Korb wurde daraufhin in 5 proz. TCA inkubiert (10 Min.) und der Vorgang mit frischer 5 proz. TCA wiederholt. Restliche TCA wurde durch anschließendes Waschen in Äther/Äthanol 1:1 und zuletzt in reinem Äther (je 5 Min. Inkubation) entfernt. Die Radioaktivität der getrockneten Filter wurde mit "Quickszint 501", die der wässrigen Proben in "Quickszint 402" in einem Szintillationszähler (Mark II, Nuclear Chicago) gemessen. Die Aufnahme und der Einbau der Radioaktivität in die Zelle bzw. in zelluläre Proteine wurde durch Abzug der Aktivität des Zellüberstandes von dem der Gesamtkultur (beide direkt bestimmt) erhalten.

2) ^{14}C-Aminosäuren

Da bei der ^{14}C-Aminosäure-Markierung höhere Radioaktivitäten eingesetzt wurden (im Durchschnitt 20 µCi/ml), wurden je 10 µl der markierten Kultur mit 90 µl eiskalter 0,05 % Chloramphenicol-Lösung verdünnt und außer daß nur jeweils 10 µl Probe eingesetzt wurde, wie in 1) vorgegangen.

2.16.2 Markierungsversuche mit ^{35}S-Methionin

2.16.2.1 Markierung mit anschließender Zellfraktionierung (s. 3.7.2)

Zellen von S. marcescens EN 6 wurden nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) 1 Std. lang mit ^{35}S-Methionin (1 µCi/ml) markiert. Die Zellen wurden nach Sedimentation (5.000 xg, 4°C) wie in 2.6.3 beschrieben mit EDTA/Lysozym aufgeschlossen und die lösliche sowie die Membranfraktion gewonnen. Vom Zellüberstand wurden je 0,6 ml mit 1,2 ml Äthanol (bei -20°C) und je 0,6 ml mit Antiserum gefällt. Die Immunfällung der verschiedenen Zellfraktionen erfolgte wie in 2.11.3.1 beschrieben.

2.16.2.2 Markierung zur Identifizierung des Protein III (s. 3.8.2.1)

Zellen von S. marcescens EN 6 wurden unter den 2.16.2.1 beschriebenen Bedingungen mit 1 µCi/ml ^{35}S-Methionin bei 30°C markiert und der Puls nach verschiedenen Intervallen, wie in Abb. 27A angegeben durch Transfer der Kultur (2 ml) in ein im Eis/NaCl-Bad vorgekühltes Zentrifugenröhrchen gestoppt, der Zellüberstand durch Zentrifugation (5.000 xg) bei 4°C gewonnen und nach 2.11.3.1 immungefällt.

2.16.2.3 Markierung bei 18°C und 42°C

Die Pulsmarkierung erfolgte nach dem in 2.16.4.1 für ^{14}C-Aminosäuren beschriebenen Grundprinzip.

2.16.2.4 Markierung mit ^{35}S-Cystein

Die Pulsmarkierung erfolgte wie die mit ^{35}S-Methionin in 2.16.2.2 beschriebenen, mit den in 3.8.3.2 angegebenen Pulsintervallen und ^{35}S-Cysteinkonzentrationen.

2.16.3 "Pulse-chase"-Versuch mit ^{35}S-Methionin

Zellen von S. marcescens EN 6 wurden nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) 10 Min. lang mit ^{35}S-Methionin (1 µCi/ml) pulsmarkiert und der "chase" durch Zugabe von auf 30°C vorgewärmtem unmarkiertem Methionin (0,5 mg/ml Endkonz.) und Chloramphenicol (0,05 mg/ml Endkonz.) eingeleitet. Nach den in Abb. 27B angegebenen Zeiten wurde der "chase" durch Eis gestoppt und die Zellüberstände (nach Sedimentation der Zellen, 5.000 xg, 4°C) nach 2.11.3.1 immungefällt.

2.16.4 Markierungsversuche mit ^{14}C-Aminosäuren

2.16.4.1 Grundprinzip

Alle Pulsmarkierungsexperimente wurden nach dem gleichen unten angegebenen Grundprinzip durchgeführt. Es wurden entweder Zellen von S. marcescens ATCC 25419, die bis in die späte logarithmische Phase (OD_{578} = 4,5) in TY-Medium gezüchtet worden waren, oder Zellen von S. marcescens

EN 6, die 2,5 Std. unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) inkubiert worden waren, markiert. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen des ^{14}C-Aminosäuregemisches, Zusatzbedingungen oder Abweichungen des hier beschriebenen Vorgehens werden in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen oder Abbildungen angegeben.

Die bei 30°C vorgezüchteten Kulturen wurden mit ^{14}C-Aminosäuren (im Durchschnitt mit 5 µCi/7,5 x 10^8 Zellen bzw. 20 µCi/ml Kultur) in Eppendorfgefäßen, Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben (je nach Volumen) bei 30°C im Wasserbad (bei längerem Puls unter Schütteln) markiert. Die Markierung unter Cysteinmangelbedingungen wurde in Anwesenheit von unmarkiertem Methionin (20 µl/ml) durchgeführt, da das ^{14}C-Aminosäuregemisch weder Methionin noch Cystein enthält. Bei Markierung in Anwesenheit der "Sekretionsinhibitoren" wurden diese in 10facher Konzentration zusammen mit den ^{14}C-Aminosäuren zur Kultur gegeben. Die Markierung wurde auf 2 Arten gestoppt: Sollten die Zellen und der Zellüberstand getrennt weiterbehandelt werden, wurden Aliquots der Kultur (mit 5 x 10^8 bis 2 x 10^9 Zellen) in ein mit gleichem Volumen an zerstoßenem Eis oder mit Eis und unmarkierten Aminosäuren (0,05 % Endkonz.; AS-Lösung (A) 2.2) gefülltes Eppendorfgefäß (oder Zentrifugenröhrchen) pipettiert und gut gemischt (Vortexmixer). Die markierte Kultur wurde 5 Min. bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Zellüberstand im Eisbad aufbewahrt und das Zellpellet entweder nach Waschen (bis zu 3mal) mit 1 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 oder ungewaschen (wird angegeben) durch Kochen in SDS, wie in 2.6.2.1 beschrieben, aufgeschlossen.

Sollte der Gesamtkulturextrakt (Zellen und Überstand) gewonnen werden, dann wurden Aliquots der markierten Kultur (mit 5 x 10^8 bis 2 x 10^9 Zellen) in ein mit gleichem Volumen an 20 % TCA (eiskalt) gefälltes Eppendorfgefäß pipettiert, gut geschüttelt (Vortexmixer) und wie in 2.6.2.2 angegeben (Aceton-Waschung, Kochen in SDS) weiterbehandelt.

Mit allen nach ^{14}C-Markierung gewonnenen Proben (Zellüberstand, Zellextrakt und Kulturextrakt) wurde eine Immunfällung wie in 2.11.3.2 beschrieben (mit Sepharose/Protein A-Behandlung) durchgeführt. Eine SDS-PAGE und Autoradiographie schloß sich an.

2.16.4.2 Markierung der Zellen verschiedener Zellstadien (s. 3.6)

Zellen von S. marcescens ATCC 25419 (WT) und S. marcescens W 831 (Proteasemangelmutante) wurden in TY-Medium gezüchtet und je 0,4 ml der Kulturen mit je 5 µCi ^{14}C-Aminosäuren während der logarithmischen Phase von OD_{578} = 0,28 - 2,5, während der späten logarithmischen Phase ab OD_{578} = 4,5, 1 Std. lang und während der Absterbephase bei OD_{578} = 5 (WT) und OD_{578} = 6,3 (Mu) 5 Std. lang markiert. Der Puls wurde durch zerstoßenes Eis gestoppt und die Kulturen bei 4°C abzentrifugiert. Der Zellaufschluß (ohne vorheriges Waschen) durch Kochen in SDS erfolgte wie in 2.6.2.1 und die Immunfällung der Zellextrakte und der dazugehörigen Zellüberstände wie in 2.11.3.2 angegeben.

2.16.5 "Pulse-chase"-Versuche mit ^{14}C-Aminosäuren

2.16.5.1 "Pulse-chase"-Versuch unter normalen Wachstumsbedingungen

1) "Pulse-chase"-Versuch mit 5 Sek. Puls

Zellen von S. marcescens ATCC 25419 wurden nach Zucht in TY-Medium bis in die späte logarithmische Phase (OD_{578} = 4,5) 5 Sek. mit ^{14}C-Aminosäuren (10 µCi/1,8 x 10^9 Zellen, 25 µCi/ml Kultur) markiert. Der "chase" (0,5, 30 und 60 Sek.) wurde mit vorgewärmten (30°C) Aminosäuren (0,33 mg/ml Endkonz.; AS-Lösung A aus 2.2) durchgeführt und mit zerstoßenem Eis gestoppt. Die Zellen (je 1,8 x 10^9) wurden bei 4°C sedimentiert und wie in 2.6.2 (b) durch Kochen in SDS (nach TCA-Fällung) aufgeschlossen. Die Immunfällung der Zellextrakte und der entsprechenden Zellüberstände wurde wie in 2.11.3.2 beschrieben durchgeführt.

2) "Pulse-chase"-Versuch mit 3, 10 und 60 Min. Puls

Spätlogarithmische Zellen von S. marcescens ATCC 25419 (TY-Medium; OD_{578} = 4,5) wurden 3 Min., 10 Min. und 60 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren (5 µCi/7,6 x 10^8 Zellen, 30 µCi/ml Kultur) bei 30°C markiert und der "chase" durch Zugabe von vorgewärmten unmarkierten Aminosäuren (0,5 mg/ml Endkonz.) und Chloramphenicol (0,1 mg/ml Endkonz.) eingeleitet. Der "chase" wurde nach 0 Min. (≙ Puls) und nach 60 Min. durch zerstoßenes Eis gestoppt und die Zellen nach Sedimentation 1mal gewaschen und dann wie 2.6.2.1 angegeben durch Kochen in SDS aufgeschlossen. Die Immunfällung der Zellextrakte

und der dazugehörenden Zellüberstände erfolgte nach 2.11.3.2.

2.16.5.2 "Pulse-chase"-Versuch mit "Sekretionsinhibitoren"

Spätlogarithmische Zellen von S. marcescens ATCC 25419 (OD_{578} = 4,5) wurden 1 Std. in Anwesenheit der in Abb. 42 angegebenen "Sekretionsinhibitoren" mit ^{14}C-Aminosäuren (5 µCi/l x 10^9 Zellen bzw. 22 µCi/ml Kultur) markiert und der Puls durch ein Gemisch (gleiches Volumen) aus unmarkierten Aminosäuren (0,045 % Endkonz.), Chloramphenicol (0,1 mg/ml Endkonz.; in 10 % MeOH) und zerstoßenem Eis gestoppt. Die Kultur wurde in 2 Teile geteilt und die Zellen (je 1 x 10^9) getrennt sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge, 4°C). Die eine Hälfte der Zellen (≙ Puls) wurde wie die Zellüberstände im Eisbad aufbewahrt, die andere Hälfte (≙ "chase") im doppeltem Volumen in vorgewärmten TY-Medium, das Chloamphenicol (0,1 mg/ml Endkonz.) enthielt, aufgenommen und 90 Min. bei 30°C inkubiert. Die Kulturen wurden dann 5 Min. bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und die Zellen wie die nach Pulsmarkierung, wie in 2.6.2.1 (b) beschrieben (nach TCA-Fällung), mit SDS gekocht. Die Zellextrakte und Zellüberstände wurden wie in 2.11.3.2 angegeben immungefällt.

2.16.5.3 "Pulse-chase"-Versuch bei verzögerter Sekretion

Das "Pulse-chase"-Experiment wurde wie in 2.16.5.1 (2) beschrieben durchgeführt, außer daß Zellen von S. marcescens EN 6 nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen markiert wurden (1 Min. Puls) und der "chase" nach verschiedenen Zeiten auch durch TCA-Fällung eines Kulturaliquots gestoppt wurde. Die einbesetzte Radioaktivität, die gefällte Zellmenge und die "chase"-Intervalle sind in Abb. 48 angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1 Suche nach einem Proteasevorläufer unter normalen Wachstumsbedingungen

Die Synthese und Sekretion der meisten bisher untersuchten exkretorischen Proteine ist ein gut gekoppelter Prozeß, so daß der Nachweis von Proformen in vivo meistens nicht gelang. Besonders bei Proteinen, die bis in das Medium ausgeschieden wurden, konnten aber in mehreren Fällen Vorstufen in zum Nachweis genügend hoher Konzentration entdeckt werden. Dies gilt für die Proformen, die temporär, aktiv oder inaktiv, zellgebunden vorliegen (10, 63, 64, 86) und für solche Proformen oder intermediäre Formen, die bis in das Medium gelangen und erst dort in die reife Form zurechtgeschnitten werden (30, 36, 63, 81). Auch die intrazelluläre Akkumulation reifer Proteine vor der Sekretion wurde beschrieben (57, 129). Da bei der Exoprotease das Vorkommen zellgebundener oder in das Medium ausgeschiedener Proformen nicht auszuschließen war und spezifisches Anti-Exoprotease-Serum (gezeigt über Immunfällung und Doppeldiffusion nach Ouchterlony) vorlag, mit dem eine solche höhermolekulare Form auch bei Inaktivität nachweisbar war, wurden S. marcescens-Kulturen während des gesamten Zellzyklus auf Proformgehalt untersucht.

3.1.1 Immunfällung aus Zellüberstand

Die Zellen von S. marcescens ATCC 25419 scheiden bevorzugt gegen Ende des logarithmischen Wachstums Exoprotease aus (Abb. 1A). Eine Protease-Vorstufe sollte demnach vor oder während der Sekretionsphase, also während der logarithmischen Phase im Medium auftauchen. Bei früheren Untersuchungen war eine höhermolekulare Proteaseform nie aufgefallen, woraus zu schließen war, falls eine solche überhaupt in den Zellüberstand gelangt, daß sie dort sofort in die reife Form übergeht. Mit Anti-Exoproteaseserum sollte eine Proform ausfällbar und somit nachweisbar sein. Zu diesem Zweck wurden Zellen in TY-Medium gezüchtet, Aliquots der Kultur während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus entnommen, im Eisbad gekühlt und der nach Zentrifugation gewonnene Zellüberstand mit Antiserum gefällt. Aus Abb. 1B geht hervor, daß in der logarithmischen Phase immer nur

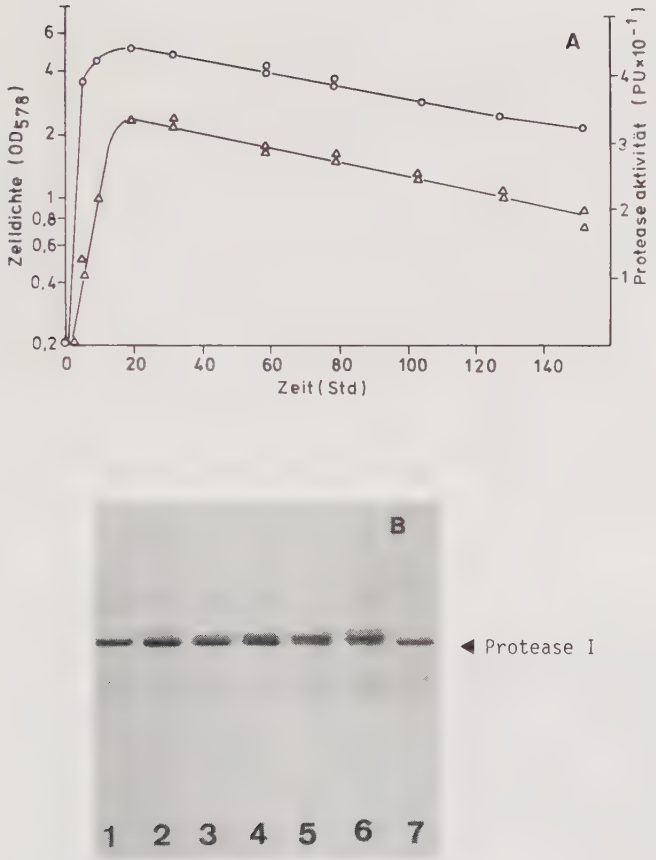

Abb. 1: Proteasesekretion von Serratia marcescens ATCC 25419 in TY-Medium.
A: Die Zellen wurden bei 30°C in TY-Medium gezüchtet, das Zellwachstum verfolgt und zu den oben angegebenen Zeiten Aliquots der Kultur abzentrifugiert und der so gewonnene Zellüberstand eingefroren. Nach 152 Std. wurde die Proteaseaktivität aller Überstände bestimmt. Zellwachstum (O), Proteaseaktivität (△).
B: Jeweils die Menge der in A gewonenen Zellüberstände, die 0,025 PU enthielt, wurde nach 2.11.3.1 mit 50 µl Antiserum gefällt und jeweils die Hälfte der Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Immunpräzipitat aus Überstand nach 5 Std. (1), 19 Std. (2), 32 Std. (3), 58 Std. (4), 103 Std. (5), 152 Std. (6). Als Kontrolle diente immungefällte reine Exoprotease (Protease I) (7). (Die schwachen Banden ober- und unterhalb der Proteasebanden stammen von Antiserum).

ein Protein, nämlich die Exoprotease, immunfällbar war. Wiederholt konnte keine höher molekulare Proteaseform während der log-Phase entdeckt werden, auch dann nicht, wenn noch keine Proteaseaktivität im Zellüberstand meßbar war. In den gleichen Abbildungen sieht man, daß aber ab der stationären Phase und besonders während der Absterbephase ein neues, um ca. 1.000 Dalton höher molekulares Protein als die Exoprotease (Bestimmung über die SDS-PAGE) auftauchte. Da dieses Protein, wie später noch bewiesen wird, proteolytisch aktiv ist, was auch schon indirekt aus dem Auftrag gleicher Aktivitätsmengen zu schließen war, wurde es Protease II genannt. Die "normale" Exoprotease, also das kleinere Protein, das als erstes (aktiv) in das Medium ausgeschieden wird und dort zumindest bis zur frühen Absterbephase die dominante Proteinbande darstellt, wird im folgenden Protease I (oder Exoprotease) genannt. Aus Abb. 2 geht hervor, daß die Protease II ein relativ stabiles Protein ist, das auch ohne vorherige Anti-

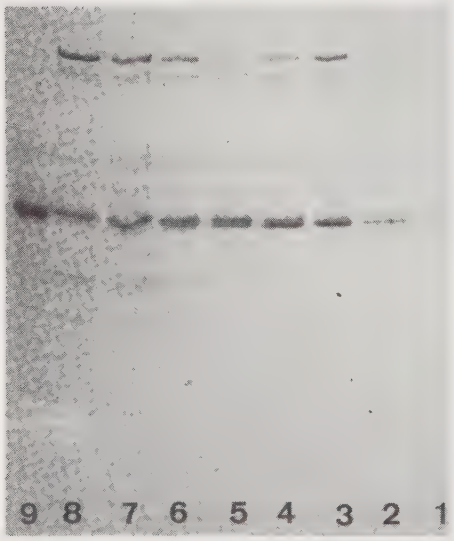

Abb. 2: Zellüberstand während 145 Std. Zucht der Zellen von S. marc. ATCC 25419 in TY-Medium. Zellüberstand wurde während der verschiedenen Wachstumsphasen durch Zentrifugation gewonnen und eingefroren. Nach 140 Std. wurden die Überstände gegen 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 dialysiert, in Elektrophoresemix gekocht und je 10 µl der Überstände in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Zuchtstunden wurden nach Vergleich der Wachstums- und Aktivitätsstunden auf die Kurven der Abb. 1 bezogen. Überstand nach 2,5 Std. (1), 5 Std. (2), 17 Std. (3), 25 Std. (4), 50 Std. (5), 80 Std. (6), 110 Std. (7) und 145 Std. (8). Als Kontrolle diente Protease I-haltiger TY-Überstand aus frühen Untersuchungen (9).

serumfällung im Zellüberstand nachweisbar bleibt. Sie liegt erst ab der stationären Phase, meistens ab der späten (wie in Abb. 1B), manchmal schon in der frühen (wie in Abb. 2) im Überstand vor. Die Bandenstärke nimmt bis zur Mitte der Absterbephase zu (stärkste Protease II-Bande in verschiedenen Experimenten nach 50 - 100 Std.) und bleibt dann bis zu 140 Std. gleich intensiv. Das Verhältnis Protease I zu Protease II verschiebt sich also während des Zellzyklus zu Gunsten der Protease II. In Abb. 2 ist deutlich die Zunahme der Protease I während der log-Phase und ihre Abnahme während der Absterbephase anhand der Bandenintensität zu erkennen. Es konnte früher gezeigt werden, daß die Abnahme der Proteaseaktivität im Medium (während der Absterbephase) durch Autolyse verursacht wird (17). Unter der Annahme, daß die Protease I, außer sich selbst, auch die Protease II verdaut und dieses Verhalten eventuell auch auf die Protease II zutrifft, war vermutet worden, daß die zunehmende und später gleichbleibende Protease II-Bandenstärke durch ständigen Nachschub dieses Proteins zustande kam. Auch schien es möglich, daß die Protease II bis zur Mitte der Absterbephase in das Medium gelangt und dann dort stabil verbleibt. Eine Umwandlung der Protease II in die Protease I durch Proteolyse schien danach im Zellüberstand nicht stattzufinden.

Die beiden Proteasebanden lagen im SDS-Polyacrylamidgel so eng bei einander, daß ihre eindeutige Erkennung nur bei Einsatz geringer Proteinmengen möglich war, auch wenn in den Originalgelen die Banden sehr viel besser zu unterscheiden waren als in den hier gezeigten Fotografien. Es konnte aber weder durch Änderung der Polyacrylamidkonzentration (z.B. 8 proz. Gel, Gradientengel) noch in einem Harnstoff-haltigen Gel eine bessere Auftrennung der beiden Banden erreicht werden.

3.1.2 Partielle Proteolyse der Protease I und II

Um außer der Kreuzreaktion mit Antiserum einen weiteren Hinweis auf die Verwandtschaft von Protease I und II zu erhalten, wurden deren Spaltprodukte nach Verdau mit Staphylococcus V8-Protease in der SDS-PAGE verglichen. Hierzu wurden in einem ersten SDS-Polyacrylamidgel die Protease I und II getrennt, was durch Auftrag von Zellüberstand aus der logarithmischen- und Absterbephase erleichtert wurde, die Proteinbanden nach Trocknen des Gels herausgeschnitten und während einer zweiten SDS-PAGE

mit V8-Protease, wie in 2.10.3 beschrieben, gespalten. Aus Abb. 3 geht hervor, daß insgesamt 4 deutlich sichtbare Spaltprodukte auftraten, wobei bei beiden Proteaseformen das gleiche Muster, je nach eingesetzter V8-Proteasekonzentration, auftrat. Zumindest ein Spaltprodukt der Protease II (A: Spalte 4) war um ca. 1.000 Dalton größer (19 K) als das entsprechende der Protease I. Dieses Peptid könnte somit, vorausgesetzt die Protease II wäre eine Proform, das Signalpeptid tragen. Auch das kleinste Protease II-Spaltprodukt (ca. 10.000 D) schien, allerdings geringfügig, größer zu sein. Um zu testen, ob die Protease II durch eine autokatalytische Reaktion in die reife Form (Protease I) gespalten wird und/oder um ein weiteres Spaltproduktmuster zu erhalten, wurden parallel zum obigen Ansatz die Proteinbanden mit gereinigter Exoprotease verdaut. In Abb. 3B ist zu sehen, daß keine Spaltung erfolgt war, da die einge-

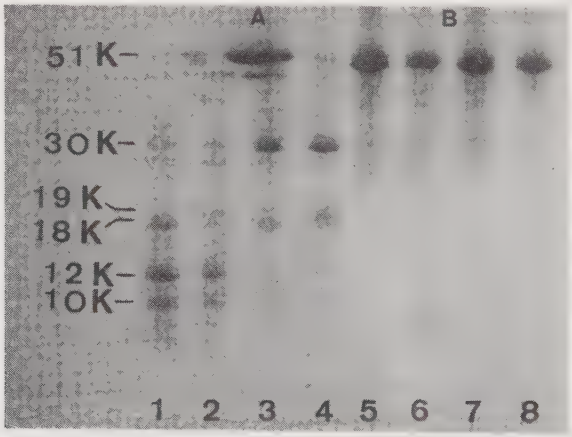

Abb. 3: Partielle Proteolyse der Protease I und II. Die Protease I-Bande (Spalte 1, 3, 5, 7) und die Protease II-Bande (Spalte 2, 4, 6, 8) wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel herausgeschnitten und während einer zweiten SDS-PAGE mit V8-Protease (A) und Exoprotease (B) gespalten. Proteasekonzentrationen pro Kammer: V8-Protease: 100 µg (1, 2) und 5 µg (3, 4); Exoprotease: 500 µg (5, 6) und 100 µg (7, 8). Eichproteine wie in 2.10.1 angegeben; Molekulargewichtsangabe in Einheiten von Tausend (K = Kilo).

gesetzten Konzentrationen vermutlich zu gering waren. Ein Übergang von Protease II in I wäre im 15 proz. Gel auch nicht erkennbar gewesen, wie die gleiche Abb. zeigt (Protease I und II in gleicher Position).

Da die Verwandtschaft durch das Auftreten identischer Spaltprodukte nach V8-Proteaseverdau, durch die oben gezeigten Immunfällungen und weiterhin durch die Ausbildung nur einer Präzipitationslinie bei Auftrag von Protease I- und II-haltigem Zellüberstand im Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test belegt worden war, wurden folgende Möglichkeiten der Protease II-Identität bzw. Funktion überlegt:

1) Die Protease II könnte die gesuchte Vorstufe der Protease I sein.
2) Sie könnte eine zellgebundene Proteaseform oder Vorstufe sein.
In beiden Fällen würde sie wahrscheinlich durch Zellyse freigesetzt.
3) Die Ausscheidung einer zweiten nahe verwandten Protease oder einer nicht mehr richtig gespaltenen Vorstufe, im späten Zellstadium, war ebenfalls denkbar.
4) Die Möglichkeit, daß es sich um eine modifizierte Form der Protease I handelt, war nicht auszuschließen.

3.2 Isolierung und Charakterisierung der Protease II

Folgende Gründe sprachen für den Proformcharakter der Protease II: Das Protein zeigte immunologische Verwandtschaft zu Protease I, es war um ca. 1.000 Dalton höhermolekular und zeigte ein identisches Peptidmuster nach V8-Proteasespaltung, wobei auch hier ein Spaltprodukt um ca. 1.000 Dalton größer als das entsprechende der Protease I war. Der Größenunterschied der beiden Proteasen war relativ gering (das kleinste bisher beschriebene Signalpeptid enthält 15 Aminosäuren (ca. 1.500 Dalton))(71), so daß die Protease II auch eine höhermolekulare Zwischenform sein konnte. Da die Protease II nicht während der aktiven Protease I-Sekretionsphase nachweisbar war und in der Absterbephase stabil vorlag, war es unwahrscheinlich, daß das Protein normalerweise aktiv in den Zellüberstand gelangt und dort in die reife Form gespalten wird, so daß davon ausgegangen wurde, daß im Zellüberstand keine Signalpeptidase vorliegt und die Protease II durch Zellyse freigesetzt wird. Da die Protease II in nachweisbarer Menge im Zellüberstand vorlag und ihr Proformcharakter am sichersten durch den Nachweis des Signalpeptids belegt würde, wurde die Protease II (und I) zur Bestimmung und zum Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz isoliert.

3.2.1 Erste Isolierung der Protease II

1) Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

Da das Hauptziel die Isolierung der Protease II war, wurde von Zellüberstand einer 140 Std. in TY-Medium gezüchteten S. marcescens ATCC 25419-Kultur mit relativ geringem Protease I-Gehalt ausgegangen. Das Verhältnis von Protease I zu II war, nach der SDS-PAGE, ca. 1:1 (Abb. 5). Der Überstand (2,12 l) wurde nach Einengen und Dialyse in der Druckkammer an DEAE-Cellulose in 10 mM $NaPO_4$-Puffer pH 7 getrennt. Die Fraktionen der eluierten Proteingipfel wurden auf Proteaseaktivität getestet und die Proteine in der SDS-PAGE identifiziert. Das Elutionsprofil ist in Abb. 4 wiedergegeben. Man sieht, daß die Hauptmasse der Proteine im Ausschlußvolumen erschien. Auch im 2. Proteingipfel, der mit 50 mM NaCl-haltigem Puffer eluiert wurde, war ein ganzes Spektrum verschiedener Proteine

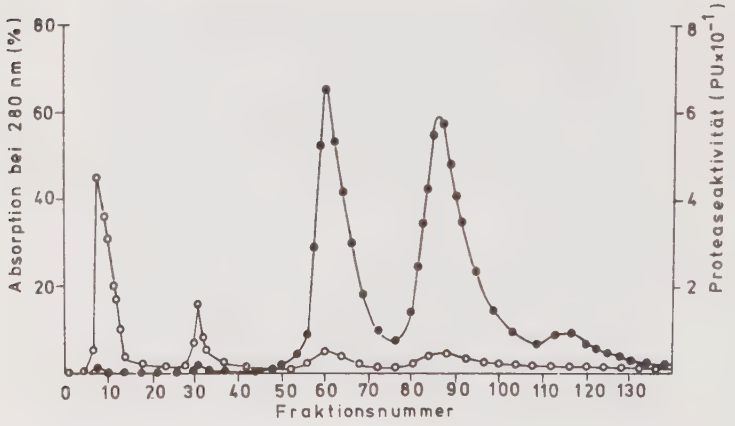

Abb. 4: Erste Isolierung der Protease II, Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose. Fraktionsvolumen: 10,5 ml, Durchflußgeschwindigkeit: 10,5 ml, Säulenvolumen: 2 x 23 cm, Absorption: (○), Proteaseaktivität (●).

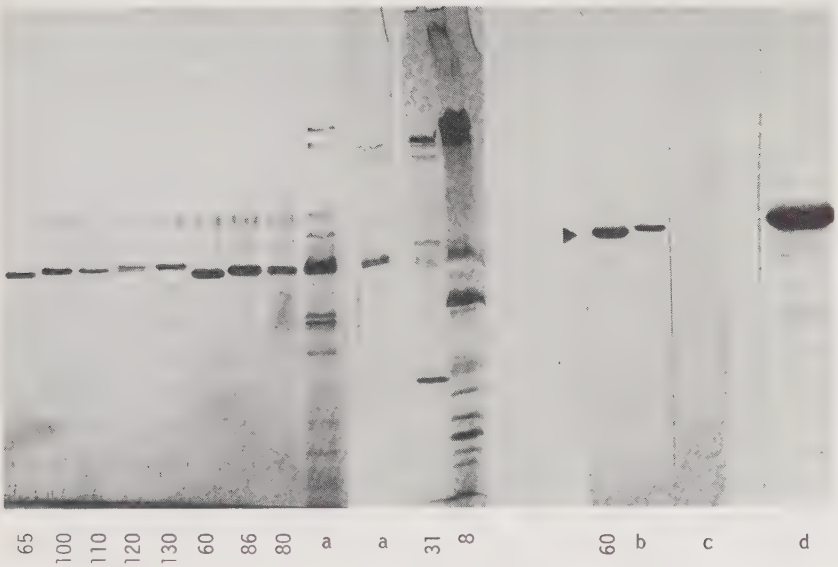

Abb. 5: Erste Isolierung der Protease II. Je 50µl der Fraktionen des 1. Säulenlaufes wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Numerierung entspricht den Fraktionsnummers (s. Abb. 4). Vom Ausgangszellüberstand wurden 10 und 50 µl aufgetrennt (a). Nach Rechromatographie der Protease II-haltigen Fraktionen wurden 50 µl des Protease II-gipfels (Fraktionsgemisch 63 - 85 des 2. Säulenlaufes) (b), 50 µl des voranlaufenden Proteasegipfels (Fr. 40 - 50) (c) und 200 µg der lyophilisierten Protease II (Fr. 63 - 85) (d) in der SDS-PAGE auf Reinheit geprüft. Die Pfeilspitze gibt die Position der Protease I an.

(wenn auch von geringerem Ausmaß als im 1. Gipfel) zu finden (Abb. 5). Die in beiden Proteingipfeln gemessene Proteaseaktivität, die weniger als 1 % der eingesetzten Aktivität ausmachte, wurde auf nicht gebundene Protease I und II zurückgeführt und vernachlässigt (s. Abb. 5). Bei anschließender Elution der Säule mit einem linearen kontinuierlichen Salzgradienten von 50 mM bis 100 mM NaCl in $NaPO_4$-Puffer pH 7 erschienen zwei große Proteasegipfel, gefolgt von einem sehr kleinen. Der erste Proteasegipfel (Fr. 55 - 70) enthielt die Protease I (Elution mit 58 mM NaCl; der Salzgehalt der Proben wurde über Leitfähigkeitsmessung bestimmt), der zweite Proteasegipfel (Fr. 80 - 110) enthielt die Protease II (Elution mit 66 mM NaCl) und im dritten Proteasegipfel (Elution

mit 76 mM NaCl) wurde ein neues Protein, das um ca. 1.000 Dalton größer als die Protease II war (und somit ca. 2.000 Dalton größer als die Protease I) entdeckt (Abb. 5). Dieses Protein wird im folgenden Protease III genannt.

Durch das gewählte Elutionsverfahren konnte die Protease I und II schon im ersten Säulenlauf von der Hauptmasse der übrigen Überstandsproteine getrennt werden und anschließend mit dem langsam ansteigenden Salzgradienten nacheinander eluiert werden. In Tabelle 1 ist das Reinigungsschema wiedergegeben. Insgesamt wurden 32 % der Ausgangsaktivität wiedergefunden. Hiervon entfielen 18,7 % auf die Protease II und 9,7 % auf die Protease I. Die spezifische Aktivität stieg von ursprünglich 0,23 PU/mg auf 10,7 PU/mg (Prot. II) bzw. 11,6 PU/mg (Prot. I) und war damit bei beiden Proteasen annähernd gleich. Die Ausbeute an Protease III lag im gesamten 3. Proteasegipfel bei 3,3 %, die spezifische Aktivität des Fraktionsgemisches 110 - 122 (auch Protease II-haltig) war 9 PU/mg und die der Fraktionen 123 - 135 (nur Protease III) war 6,1 PU/mg. Mit Zunahme der Proteingröße war somit eine Zunahme der negativen Ladung und eine Abnahme der spezifischen Aktivität der Proteasen (besonders bei Protease III) festzustellen.

2) Rechromatographie der Protease II-Fraktionen mit DEAE-Cellulose

Die vereinigten Fraktionen mit Protease II (80 - 110) wurden an DEAE-Cellulose rechromatographiert, da eine Verunreinigung durch die beiden anderen Proteasen nicht auszuschließen war und da nach der SDS-PAGE noch mindestens 3 Fremdproteine die Probe verunreinigten (Abb. 5). Die Säulenchromatographie wurde wie oben (1) durchgeführt, außer daß der Salzgradient sofort angelegt wurde. 64 % der eingesetzten Aktivität konnten im Protease II-Gipfel wiedergefunden werden (Tab. 1). Ein kleiner Protease I- und II-haltiger Protease-Gipfel war vorauslaufend abgetrennt worden (Elutionsprofil wie in Abb. 6). Die spezifische Aktivität der Protease II, die durch Ultrafiltration und Dialyse vor dem Auftrag auf 14,2 PU/mg angestiegen war, konnte durch den 2. Säulenlauf mit anschließender Dialyse (gegen Aqua dest.) nur noch auf 14,9 PU/mg erhöht werden.

Tab. 1: Erste Isolierung der Protease II.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamte Aktivität (PU)	Protein (mg)	Spezifische Aktivität (PU/mg)	Ausbeute (%)
Kulturüberstand	2120	1221,1	5326,5	0,23	100
Ultrafiltration und Dialyse	41	881,5	205	4,3	72,2
1. DEAE-Säule Fr. 80 - 110	321	228,8	21,5	10,7	18,7
Ultrafiltration und Dialyse	18,2	123,7	8,7	14,2	10,6
2. DEAE-Säule Fr. 63 - 85	254	79,5	5,5	14,5	6,2
Dialyse	257	38,9	2,6	14,9	3,2
Protease I					
1. DEAE-Säule Fr. 55 - 70	148	118	10,1	11,6	9,7
Dialyse	145	70,5	6,2	11,3	2,6
Protease III (+ II)					
1. DEAE-Säule Fr. 110 - 122	123	21,7	2,4	9	1,8
Protease III					
1. DEAE-Säule Fr. 123 - 135	136	17,7	2,9	6,1	1,5

Die Ausbeute, bezogen auf die Ausgangsaktivität, lag bei 3,2 %, die gewonnene Proteinmenge war 2,6 mg (Tab. 1). Die geringe Ausbeute war zumindest teilweise auf die hohen Verluste (bis zu 50 %) bei der Einengung und Dialyse zurückzuführen.

3) Test der isolierten Protease II auf Reinheit

Die isolierte Protease II wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und über die Aminosäurezusammensetzung (Tab. 4), die später behandelt wird, auf Reinheit überprüft.
Aus Abb. 5 geht hervor, daß das Fraktionsgemisch des Protease II-Gipfels nach der 2. Säulenchromatographie nur noch eine höhermolekulare Bande in der SDS-PAGE aufwies, die, wie sich herausstellte, auf einen Geleffekt zurückzuführen war (Abb. 7 b+d). Die nach dem 1. Säulenlauf noch störenden Fremdproteine und auch die noch enthaltene Protease I waren durch die Rechromatographie entfernt worden. Nach Auftrag höherer Proteinmenge

(200 µg) des lyophilisierten Materials waren keine Verunreinigungen zu erkennen, wohl aber einige niedermolekulare Spaltprodukte, die auch bei der Protease I nach der Lyophilisation auftauchten (Abb. 5 d). Es konnte somit davon ausgegangen werden, daß reine Protease II vorlag.

3.2.2 Zweite Isolierung der Protease II

Da die Ausbeute der 1. Isolierung der Protease II mit 2,6 mg für die Durchführung von Aminosäureanalysen und besonders Sequenzanalysen zu gering war, wurde die Isolierung mit ca. 5fachem Einsatz an Ausgangsmaterial wiederholt. Das oben benutzte Reinigungsschema hatte sich bezüglich der Trennung der Proteasen und der Gewinnung reinen Endmaterials bewährt und wurde deshalb auch diesmal angewandt.

1) Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Celluluse

11,55 l Überstand einer 120 Std. in TY-Medium gezüchteten Kultur diente als Ausgangsmaterial. Er wurde, da die Protease in großem Volumen mit Ammonsulfat nicht ausfällbar war, wieder in der Druckzelle eingeengt. Ansonsten wurde auf die Ultrafiltration, die zu hohen Verlusten geführt hatte, verzichtet und die Dialysen in Schläuchen, die nachgewaschen wurden, durchgeführt. Die Elution erfolgte wie in der 1. Isolierung und lieferte ein vergleichbares Profil. Es konnte allerdings kein Protease III-Gipfel entdeckt werden und das Verhältnis von Protease I zu II war ca. 2:3, was auch aus Tab. 2 abzulesen ist. Nur insgesamt 16 % der Ausgangsaktivität wurden wiedergefunden, wobei zu beachten ist, daß nur noch 56 % aufgetragen werden konnten (nach Einengen und Dialyse). Die Protease I wurde diesmal schon mit 0,05 M NaCl, die Protease II mit 0,068 M NaCl eluiert. Die spezifische Aktivität war von ursprünglich 0,45 PU/mg bei Protease I auf 9,3 PU/mg und bei Protease II sogar auf 14,3 PU/mg (also höher als bei der ersten Isolierung) gestiegen. Das Bandenmuster der Gipfel nach Durchführung einer SDS-PAGE entsprach dem der 1. Isolierung in Abb. 5 (weshalb auf eine Darstellung verzichtet wird) und machte eine Rechromatographie erforderlich.

Tab. 2: Zweite Isolierung der Protease II.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamte Aktivität (PU)	Protein (mg)	Spezifische Aktivität (PU/mg)	Ausbeute (%)
Kulturüberstand	11550	12197,2	26903	0,45	100
Ultrafiltration	74	7374,8	2164,5	3,4	60,5
Dialyse	93	6851	964,9	7,1	56,2
1. DEAE-Säule Fr. 90 - 110	208	1206,4	84,2	14,3	9,9
Dialyse	205	1086,5	62	17,5	8,9
2. DEAE-Säule Fr. 150 - 185	378	585,7	30,5	19,2	4,8
Dialyse	400	210,6	22,8	9,2	1,7
2. DEAE-Säule Fr. 150 - 164	158	442,4	23,1	19,2	3,6
Dialyse	172	97,4	16,3 18,7*)	6	0,8
2. DEAE-Säule Fr. 105 - 185	220	143,3	7,4 6,9*)	19,3	1,2
Dialyse	228	113,2	6,5	17,4	0,93
Protease I					
1. DEAE-Säule Fr. 71 - 81	111	739,3	79,4	9,3	6,1
Dialyse	111	739	51,1	14,5	6,1

*) gravimetrische Messung

2) Rechromatographie der Protease II-Fraktionen

Die Fraktionen 90 - 110 des Protease II-Gipfels wurden nach der Dialyse ohne vorheriges Einengen auf eine neu gepackte DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Es wurde wie bei der vorangegangenen Säule eluiert. Wie bei der ersten Isolierung tauchten auch diesmal zwei Protease-Gipfel auf. Der kleine erste Gipfel (Fr. 100 - 130) entsprach der Protease I und der Hauptgipfel (Fr. 140 - 190) der Protease II (Abb. 6). Dieser enthielt noch 54 % der aufgetragenen Aktivität (Tab. 2). Die spezifische Aktivität der Protease II stieg diesmal nach dem 2. Säulenlauf deutlich an und lag bei 19,2 PU/mg.

Aus Abb. 8 geht hervor, daß ungefähr die Hälfte des Protease III-Gipfels noch Spuren von Protease I enthielt. Auch konnte bis Fraktion 156 ein Protein festgestellt werden, das unterhalb der der Protease I lief und eventuell ein Spaltprodukt war. Ab Fraktion 160 war nach der SDS-PAGE

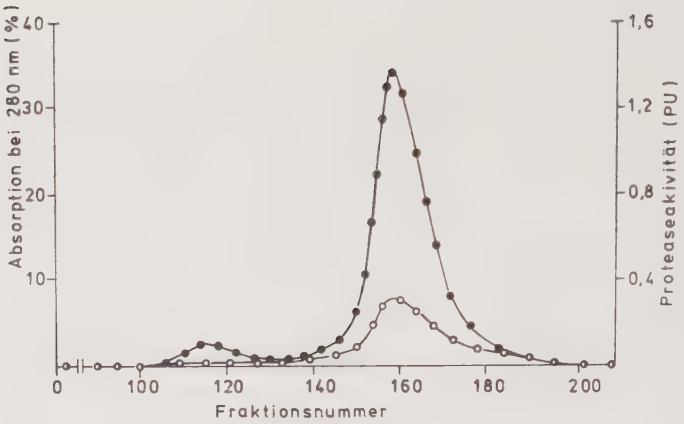

Abb. 6: Zweite Isolierung der Protease II, Rechromatographie an DEAE-Cellulose. Fraktionsvolumen 11 ml, Durchflußgeschwindigkeit 11 ml/Std., Säulenvolumen 2 x 20 cm, Absorption (o), Protease-Aktivität (●).

weder Protease I noch das niedermolekulare Protein zu erkennen. Die Fraktionen 150 - 164 und 165 - 185 wurden deshalb getrennt weiterbehandelt. Nach Dialyse des Fraktionsgemischs 150 - 164 sank die spezifische Aktivität von 19,2 PU/mg auf 6 PU/mg, bei Fraktionsgemisch 165 - 185 von 19,3 PU/mg auf 17,4 PU/mg. Die Dialyse, besonders bei schon gereinigtem Protein (gegen Aqua dest.) bewirkte demnach eine teilweise Inaktivierung der Protease II. Die Vermutung wurde durch die Tatsache bestärkt, daß ein Teil der Protease II nach Zentrifugation dialysierter Protease II-Lösung im Pellet erscheint (Identifizierung durch SDS-PAGE), was auf Denaturierung zurückzuführen ist. Insgesamt konnten 22,8 mg Protease II isoliert werden, wovon 16,3 mg noch Spuren von Protease I enthielten (Fraktion 150 - 164) und 7,4 mg Protease I-freie Protease II (Fraktion 165 - 185) waren.

3) Prüfung der isolierten Protease II auf Reinheit:

Aus Abb. 8 war schon hervorgegangen, daß die Protease II-Fraktion ab Fraktion 160 keine sichtbaren Mengen mehr an Protease I enthielt, wobei natürlich die schlechte Auflösung des Gelsystems keine absoluten Aussagen zuläßt. Dennoch müßten Verunreinigung bis zu 5 - 10 % bei

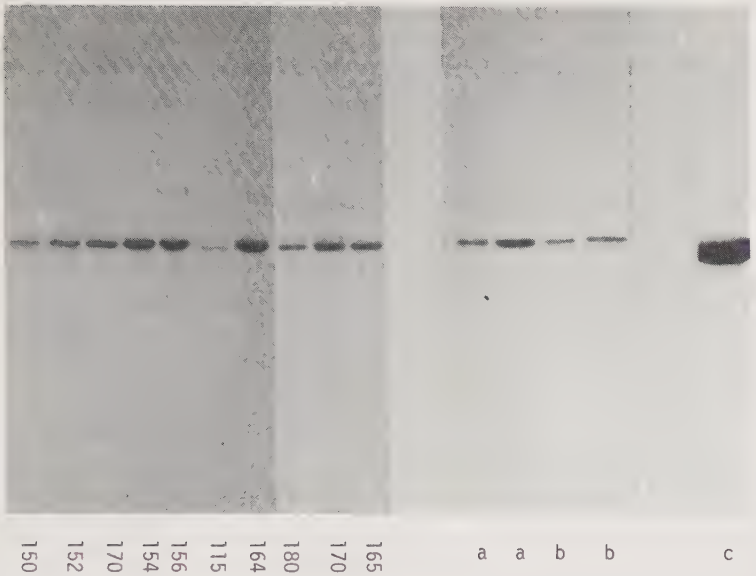

Abb. 8: Zweite Isolierung der Protease II, Rechromatographie. Je 10-25 µl der einzelnen Fraktionen des 2. Säulenlaufes (Numerierung gemäß der Fraktionsnummer, s. Abb. 6), des Fraktionsgemisch 150 - 164 (a) und 165 - 185 (b) und 300 µg der lyophilisierten Protease II (Fr. 165 - 185) (c) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Pfeil markiert die Protease II-Position.

Auftragsmengen wie in Abb. 8 noch zu erkennen sein. Aus dem Proteinmuster nach Auftrag einzelner Fraktionen und nach Auftrag eines Aliquots der Gesamtfraktion 165 - 185 sollte hier eine reine Protease II vorliegen, bei Fraktion 150 - 164, die nach Auftrag einzelner Fraktionen in der SDS-PAGE und des Gemischs noch Protease I bzw. die darunterliegende Bande zeigt, könnte eine Verunreinigung von Protease I, die rd. 5 % ausmacht, vorliegen (Abb. 8, Spalte a+b). Die Abb. 8 zeigt, daß beide Protease II-Fraktionen, nach der SDS-PAGE, durch keine anderen Fremdproteine mehr verunreinigt waren.

3.2.3 Isolierung der Protease I

Die Protease I-haltigen Fraktionen der beiden vorangegangenen Anionenaustauschchromatographien (Fraktion 55 - 70 und 71 - 81, jeweils des 1. Säulenlaufes) wurden als Ausgangsmaterial eingesetzt. Nach Dialyse, aber ohne Einengung, wurden diese auf eine wie oben verwendete DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und mit salzfreiem Puffer (10 mM $NaPO_4$ pH 7) nachgewaschen. Nach Einsatz von 0,04 M NaCl in Phosphatpuffer konnte ein erster kleiner Proteingipfel eluiert werden, der keine Proteaseaktivität aufwies. Die Protease I erschien nach Erhöhung der Salzkonzentration auf

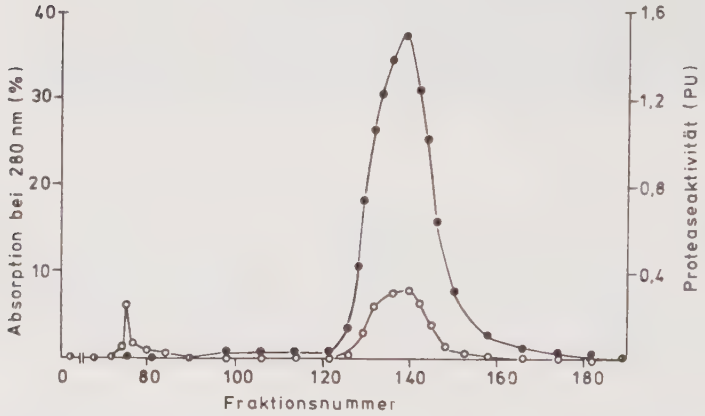

Abb. 9: Isolierung der Protease I, Rechromatographie an DEAE-Cellulose, Fraktionsvolumen 11 ml, Durchflußgeschwindigkeit 11 ml/Std., Säulenvolumen 2 x 20 cm, Absorption (o), Proteaseaktivität (●).

Tab. 3: Isolierung der Protease I.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamte Aktivität (PU)	Protein (mg)	Spezifische Aktivität (PU/mg)	Ausbeute (%)
Kulturüberstände	13670	13418,3	32229,5	0,42	100
Ultrafiltration Dialyse	134	7732,5	1169,9	6,6	57,6
1. DEAE-Säulen Fr. 55 - 70 und Fr. 71 - 81	259	857,3	89,5	9,6	6,4
Dialyse	256	809,5	57,3	14,1	6
2. DEAE-Säule Fr. 125 - 150	265	744,5	38,7	19,2	5,5
Dialyse	295	649	32,5 30,7*)	20	4,8

*) gravimetrische Messung

0,05 M NaCl (Abb. 9). Auf die Eluierung der restlichen Protease II wurde verzichtet. Eine Reinigungsübersicht gibt Tabelle 3; in Tabelle 1 und 2 sind die ersten Säulenläufe der beiden eingesetzten Protease I-Fraktionsgemische wiedergegeben. Nach den ersten Säulenläufen war insgesamt 6,4 % der Ausgangsaktivität gefunden worden. Die spezifische Aktivität konnte von 0,42 PU/mg auf 9,6 PU/mg gesteigert werden. Die Rechromatographie lieferte 92 % der eingesetzten Aktivität, was im Vergleich in den Protease II-Isolierungen enorm hoch war. Die spezifische Aktivität stieg hierbei auf 19,2 und lag nach der Dialyse (gegen Aqua dest.), die bei der Protease I nicht zu solch hohen Verlusten wie bei Protease II führte, bei 20 PU/mg. Insgesamt betrug die Ausbeute 4,8 %. 32,5 mg Protease I waren isoliert worden.

Prüfung der isolierten Protease I auf Reinheit

Sowohl nach Auftrag der einzelnen Fraktionen des Protease I-Gipfels als auch nach Auftrag des lyophilisierten Fraktionsgemisches in der SDS-PAGE konnten keine Fremdproteine entdeckt werden. Bei Auftrag hoher Proteinmenge (ca. 300 mg) erschien eine Reihe niedermolekularer Spaltprodukte (Abb. 10). Eine Verunreinigung durch Protease II war nach der SDS-PAGE nicht zu entdecken und nach der Elutionsmethode auszuschließen.

Abb. 10: Isolierung der Protease I, Rechromatogramm an DEAE-Cellulose. 5 - 15 µl des Protease I-Gipfels aus Abb. 9 (die Numerierung entspricht der Fraktionsnummer) und 300 µg (a) bzw. 100 µg (b) der lyophilisierten Protease I (Fr. 125 - 150) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

3.2.4 Test der immunologischen Identität der isolierten Proteasen

Durch Immunfällung der Protease I und II aus Zellüberstand war die immunologische Verwandtschaft schon gezeigt worden (Abb. 1). Auftrag gleicher Proteinmengen der gereinigten Protease I und II im Ouchterlony-Diffusionstest ergab bei beiden Proteinen je nach eingesetzter Konzentration identische Präzipitationslinien. Diffundierten Protease I und II aus dem gleichen Loch gegen Antiserum, resultierte daraus nur 1 Linie. Die Präzipitationslinien der Protease I und II (in nebeneinander liegenden Depots) gingen vollständig ineinander über (Abb. 11A). Hieraus kann geschlossen werden, daß Protease II und II immunologisch identisch sind (bei nur teilweiser Verwandtschaft wäre Spornbildung aufgetreten) und ungefähr gleich gute Antigene darstellen.

Auch die Protease III war immunpräzipitierbar und auch ihre Präzipitationslinien gingen im Ouchterlony-Diffusionstest in die von Protease I und II über, so daß auch hier immunologische Identität vorliegt (Abb. 11B).

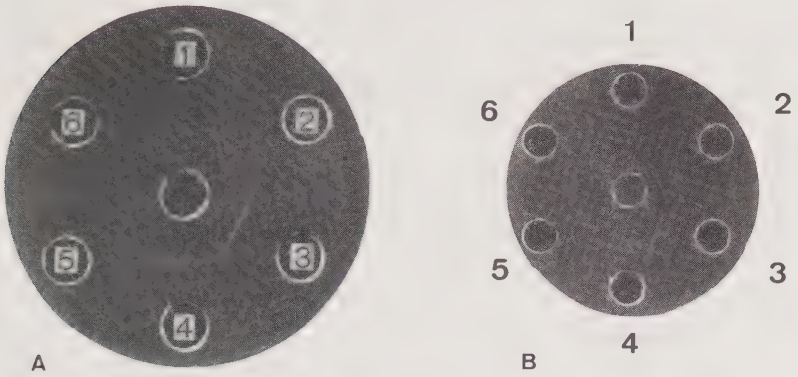

Abb. 11: Doppeldiffusion nach Ouchterlony mit Protease I, II und III.
A: Reine Protease I: 10 µg (1), 5 µg (4), reine Protease II: 10 µg (2), 5 µg (5), je 5 µg Protease I und II (3) und 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,in dem die Proteasen gelöst waren (6) diffundierten gegen 40 µl Antiserum im zentralen Loch.
B: Protease-haltige Fraktionen des 1. Säulenlaufs der 1. Isolierung der Protease II, Abb. 7, wurden wie folgt eingesetzt: 40 µl + 20 µl der Fr. 60 mit Protease I (1+4), 40 µl + 20 µl der Fr. 87 mit Protease II (2+5) und 40 µl + 20 µl der Fr. 125 mit Protease III (nach Aufnahme des Lyophilisats von 1 ml Probe in 0,1 ml Aqua dest.) (3+6).

3.2.5 Aminosäureanalyse der Protease I und II

Die Aminosäurezusammensetzung der isolierten Protease I und II wurde, wie in 2.9.1 beschrieben, bestimmt. Die in Tab. 4 wiedergegebenen Werte, ausgedrückt als Zahl der Aminosäurereste in einer Polypeptidkette, wurden auf das Molekulargewicht der Protease I von 53.000 Dalton (Mittelwert nach Größenbestimmung über Gelfiltration und SDS-PAGE) (17) bezogen. Protease I und II zeigten hohe Übereinstimmung in der Aminosäurezusammensetzung. Geringe Schwankungen der einzelnen Aminosäurerestezahl, die bei der Analyse verschiedener Protease I- oder Protease II-Präparate und ebenfalls zwischen Protease I- und II-Analysen vorkamen, liegen im Fehlerbereich der Meßmethode.

Tab. 4: Aminosäurezusammensetzung der Protease I und II aus S. marcescens ATCC 25419 und der Protease aus S. marcescens DSM 30122.

Aminosäuren	Protease II 1.Isolierung	Protease II 2.Isolierung Fr. 150-164	Protease II 2.Isolierung Fr. 165-185	Protease I 1./2.Isolierung	Protease I Isolierung f. Immunsierung	Protease I ATCC 25419 (17)	Protease DMS 30122 (18)
Lys	21	18	17	19	20	19	18
His	12	12	12	13	12	14	13
Arg	12	10	10	11	11	11	10
Asp	82	82	82	82	82	82	83
Thr	37	40	36	37	36	34	35
Ser	45	45	40	40	38	35	36
Glu	49	52	47	49	47	45	44
Pro	12	17	17	16	9	9	15
Gly	64	68	67	66	67	64	62
Ala	58	53	51	53	54	49	50
Cys	0	0	0	0	0	0	0
Val	28	28	27	28	30	28	29
Met	(1)[a]	(1)[a]	(1)[a]	(1)[2]	1[a]	(1)[a]	1[a]
Ile	21	22	20	22	24	22	24
Leu	24	30	30	32	25	29	30
Tyr	13	19	18	18	14	18	17
Phe	30	31	30	31	29	32	33
Trp	-[b]	-[b]	-[b]	-[b]	-[b]	-[b]	-[b]

a: Methionin wurde durch Bromcyanspaltung bestimmt, ( )[a]: Methionin wurde nicht bestimmt, muß aber angenommen werden.
b: Tryptophan wurde nicht bestimmt.

Die Aminosäureanalysen bestätigten damit die hohe Verwandtschaft der Proteasen I und II. Die Erkennung der zu erwartenden zusätzlichen Aminosäuren bei Protease II (Signalpeptid) war mit dieser Methode nicht möglich. Die Analysen bestätigten ebenfalls die hohe Reinheit der Proteine, da sie in der Aminosäurezusammensetzung denen früher isolierter Proteasen (17, 18) entsprachen und weder Cystein noch Methionin entdeckt werden konnte (auf die Bestimmung des Methionin mit Hilfe der Bromcyanspaltung wird später eingegangen).

3.2.6 Bestimmung der C-terminalen Sequenz

Durch die Entdeckung der Protease III, die mit 53.000 Dalton um 2.000 Dalton größer als die Exoprotease (51.000 Dalton) war, wurde die Vermutung, daß die Protease II (52.000 Dalton) nur eine Zwischenform bei der Entstehung der Protease I war (unter der Voraussetzung, daß beide höhermolekulare Proteasen-Vorstufen waren) bestätigt. Da die Protease III (eventuell die primäre Proform) in zu geringer Menge vorlag, die Protease II aber in genügender Konzentration rein isoliert worden war, wurden die Sequenzanalysen mit der Protease I und II durchgeführt. Die Protease II sollte durch Nachweis eines N-terminalen Zusatzpeptids bei gleichem C-Terminus als Vorläuferprotein der Protease I identifiziert werden.

Die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren erfolgte durch Spaltung der Proteasen mit Carboxypeptidase A, die bevorzugt Aminosäuren mit aromatischen oder langen aliphatischen Seitenketten freisetzt, und mit Carboxypeptidase B, die bevorzugt bei Lysin und Arginin spaltet. Die Spaltung erfolgte in einem Dialysesack bei 37°C (im Wasserbad unter Schütteln) und die dabei freigesetzten Aminosäuren wurden nach Lyophilisation der Dialyseflüssigkeit im Aminosäureanalysator identifiziert. Zur Kontrolle des CPA-Zerfalls wurde immer eine Probe ohne Substrat mitgetestet und der Grad der Dialyse wurde durch Zugabe von Norleucin bestimmt (s. 2.13.1).

Die Protease I, 20 nMol und 100 nMol, wurde von der Carboxypeptidase B bei einem Enzym-Substratverhältnis von 1:65 (E:S = 1:65) innerhalb 5 Std. und 1 Std. nicht angegriffen. Demnach ist weder Lysin noch Arginin die C-terminale Aminosäure (Daten nicht gezeigt).

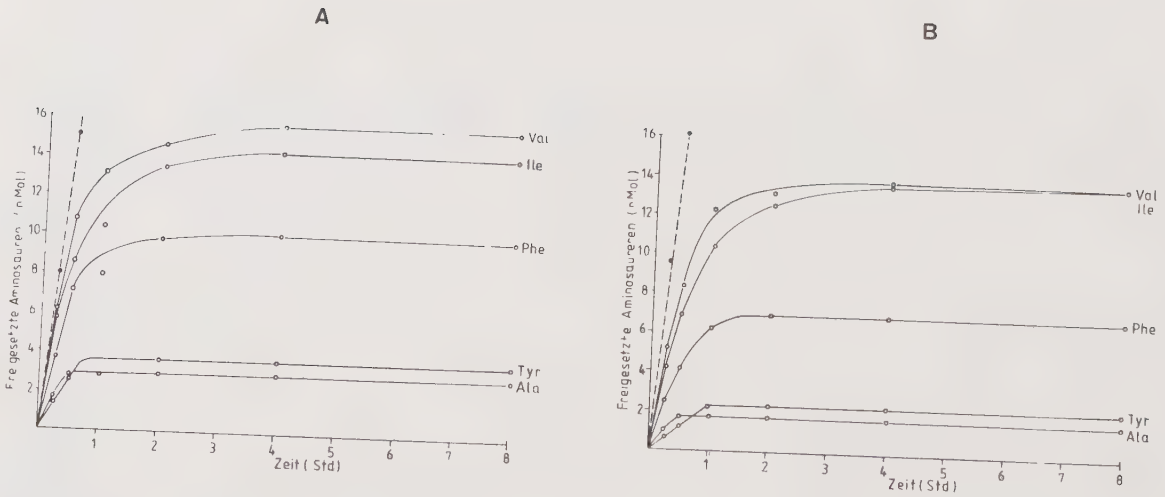

Abb. 12: 1. CPA-Spaltung der Protease I und II. Je 50 nMol der Protease I (A) und II (B) wurden mit CPA (E:S = 1:75) bei 37°C in einem Dialysesack gespalten. Nach 15 Min., 30 Min., 60 Min., 2 Std., 4,5 Std. und 8 Std. wurde die Dialyseflüssigkeit (mit den freigesetzten Aminosäuren) gegen neue ausgetauscht und die Spaltung (bis zur nächsten Entnahme) fortgesetzt. Die Dialyseflüssigkeiten wurden lyophilisiert und die Aminosäuren im Aminosäureanalysator identifiziert (in der Abb. angegeben). Der Grad der Diaylse wurde durch Zugabe von 50 nMol Norleucin/Ansatz bestimmt (---).

Eine Spaltung der Protease I und II mit der Carboxypeptidase A (CPA) zeigt die Abb. 12. Hier wurden 50 nMol der Proteasen mit CPA bis zu 8 Std. inkubiert (E:S = 1:75) und nach den in der Abb. angegebenen Zeiten die Dialyseflüssigkeit mit den abgespaltenen Aminosäuren entnommen und durch frische (bis 0,5 Std. Aqua bidest., danach 0,05 M N Ethylmorpholinacetat pH 8,5) ersetzt (die optimale Dialyse gegen 0,2 M Puffer konnte nicht durchgeführt werden, da der Puffer in hoher Konzentration die Aminosäureanalyse (Gipfel nach Lysin) störte). Bei beiden Proteasen wurden nach CPA-Spaltung die gleichen Aminosäuren in gleicher Reihenfolge freigesetzt. Die Ausbeute (bezogen auf die eingesetzte Proteasekonzentration) betrug für Valin 31,6 % bei Protease I und 27,4 % bei Protease II. Nach dieser Spaltung läge bei beiden Proteinen folgender C-Terminus vor: Tyr-Ala-Phe-Ile-Val-COOH. Diese Reihenfolge änderte sich unter folgenden Spaltbedingungen: 75 nMol der Proteasen wurden 30 Min. mit CPA (E:S = 1:65) bei 37°C gespalten und die Dialyse noch durch 1,5 Std. Schütteln bei 4°C vervollständigt. Danach wurde frische CPA zur Probe gegeben (E:S = 1:32), weitere 4,5 Std. bei 37°C inkubiert, der Vorgang wiederholt (E:S = 1:32) und die Spaltung nach insgesamt 20 Std. beendet. Aus Abb. 13 geht hervor, daß innerhalb von 30 Min. (bzw. 2 Std. mit Dialyse bei 4°C) die maximale Freisetzung der meisten Aminosäuren schon erreicht war und Zugabe von frischer CPA (Dialyse gegen Aqua bidest.) die Ausbeute nicht mehr wesentlich erhöhte (außer bei Asp). Beide Proteasen zeigten wieder das gleiche Spaltungsverhalten und die Ausbeute lag bei der Protease I bei 40,4 % (Val) bzw. 51,4 % (Phe) und bei der Protease II bei 29,2 % (Val) bzw. 37,4 % (Phe). Zwei weitere Aminosäuren, Leucin- und Asparaginsäure, konnten durch den Einsatz höherer Enzym- und Substratkonzentrationen freigesetzt werden. Aus den Ergebnissen der beiden durchgeführten Spaltungen muß geschlossen werden, daß Phenylalanin am C-Terminus der Proteasen mehrfach vorliegen muß. Bei langsamer sukzessiver Spaltung wird eindeutig Phenylalanin nach Valin und Isoleucin abgespalten und nimmt insofern eine Sonderrolle ein, da es als einzige der Aminosäuren große Abstände zu den davor und danach liegenden Aminosäurepaaren aufweist (Abb. 12). Bei rascher, fast vollständer CPA-Spaltung (Abb. 13) ist die Reihenfolge der Aminosäuren schwer festzulegen. Hier spricht die erhöhte Ausbeute von Phenylalanin im Vergleich zur 1. Aminosäure (Val) der ersten Spaltung und besonders die Tatsache, daß zu-

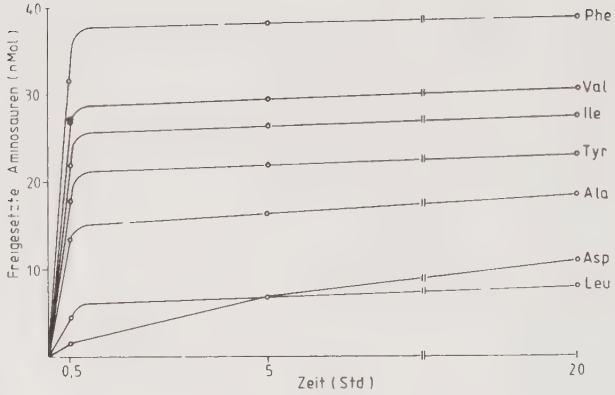

Abb. 13: 2. CPA-Spaltung der Protease I und II. Die Spaltung erfolgte wie im Text angegeben. Norleucin (●).

mindest bei der Protease I nach 30 Min. mehr Phe im Dialysat als N-Leucin, das frei vorliegt und demnach schneller diffundieren müßte, erscheint, für ein mehrfaches Vorliegen von Phenylalanin. Den Beweis, daß diese Vermutung stimmte, lieferte die in Abb. 14 wiedergegebene Spaltung. Hier wurden 20 nMol Protease I mit niedriger CPA-Konzentration (E:S = 1:125) 4 Std. inkubiert (Dialyse gegen Aqua bidest.), anschließend, nach Entnahme der Dialyseflüssigkeit der Enzym- und Substrat-haltige Dialysesack gegen 0,2 M N-Ethylmorpholinacetat pH 8,5 bei 4°C dialysiert, um wieder optimale Spaltbedingungen zu bekommen und eine 2. Spaltung mit frischem Enzym (E:S = 1:62) angeschlossen. Die Reihenfolge der Aminosäurefreisetzung innerhalb 4 Std. erfolgte wieder wie in Abb. 13: Val-Ile-Phe-Ala-Tyr-Leu-Asp.... Nach weiterer Inkubation konnte unter diesen Bedingungen eine Steigerung der Aminosäurefreisetzung beobachtet werden, besonders bei Phe und Tyr. Phenylalanin, das nach 24 Std. mit 30,5 nMol einen weit höheren Wert als die eingesetzte Protease I (20 nMol) aufwies (Ausbeute 152,5 %), muß demnach mindestens zweimal am C-Terminus vorkommen. Auch der starke Anstieg von Tyrosin, das nach 20 Std. die zweithöchste Endkonzentration (96,3 % Ausbeute) hatte, muß mit Mehrfachspaltung gedeutet werden. Gleiches könnte auch für die Asparagininsäure, deren be-

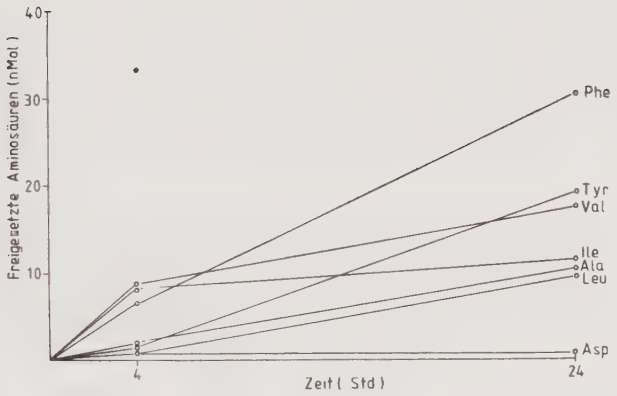

Abb. 14: Dritte CPA-Spaltung mit Protease I. Die Spaltung erfolgte wie im Text angegeben. Norleucin (•).

kannt langsame Freisetzung durch die CPA, wohl neben dem Verbrauch des Enzyms,die Reaktion meistens bei Asp beenden ließ, liegen am C-Terminus der Proteasen ausschließlich Aminosäuren mit unpolarem Rest und die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin vor. Die exakte Bestimmung einer C-terminalen Aminosäuresequenz durch Carboxypeptidasen bedarf intensiverer Untersuchungen als es hier erfolgte. Das Ziel, der Nachweis identischer C-Termini bei Protease I und II konnte aber eindeutig aufgrund der erhaltenen Spaltungsmuster erreicht werden. Die hypothetische Aminosäuresequenz des COOH-Endes beider Proteasen ist in Abb. 15 wiedergegeben. Auch bei der Protease aus S. marcescens DSM 30122 muß die gleiche C-terminale Aminosäuresequenz angenommen werden, da nach CPA-Spaltung das gleiche Spaltverhalten wie bei den Proteasen aus S. marcescens ATCC 25419 festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

... Asp-Asp-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Phe-Phe-Ile-Val-COOH
? ?

Abb. 15: Sequenzvorschlag für die C-Termini der Protease I und II aus S. marcescens ATCC 25419 und der Protease aus S. marcescens DSM 30122.

3.2.7 Bestimmung der N-terminalen Sequenz

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz von Protease I und II erfolgte durch automatischen Edman-Abbau in einem Beckman-Sequenzer. Es wurden zweimal im Abstand von ca. einem Jahr Sequenzerläufe mit identischem Probenmaterial (Lyophilisat bei 4°C gelagert) aus den oben beschriebenen Isolierungen (Fraktionsgemisch 165 - 185 bei Protease II) durchgeführt.

Alle drei Sequenzerläufe mit Protease I (2 x 1 mg, 1 x 1,25 mg) wurden nach Dialyse der Proben gegen 5 proz. Ameisensäure durchgeführt und lieferten eine Ausbeute von ca. 15 %, bezogen auf die Einwaage. Nach dem ersten Sequenzerlauf schien die Protease I am N-Terminus stark heterogen zu sein: 60 % des Materials begann mit NH_2-Ala-Ala-Thr-Gly und 40 % mit NH_2-Ala-Thr-Gly. Die beiden nachfolgenden Sequenzerläufe (nach 1 Jahr) mit identischem Material lieferten viel schwächere Heterogenität mit 80 - 90 % der Ala-Ala-Thr und 10 - 20 % der Ala-Thr Komponente. Ansonsten war die nachfolgende Sequenz von 30 bestimmten Aminosäuren bei allen drei Läufen bis auf wenige Ausnahmen identisch (Abb. 16).

Nach Dialyse der Protease II (1,25 mg) wurde die gleiche Aminosäuresequenz wie bei Protease I, mit einer N-terminalen Heterogenität von 20 - 30 % der Ala-Ala-Thr Komponente und 70 - 80 % der Ala-Thr Komponente gefunden. Die Ausbeute war allerdings mit nur 2,3 % um 15 % geringer als bei Protease I. Beim Sequenzerlauf nach einem Jahr (je 1 mg Protease II) wurde mit nicht dialysierter Probe ebenfalls die für die Protease I bestimmte Sequenz erhalten. Auch hier dominierte die Ala-Thr-form mit 70 - 80 % und die Ausbeute lag bei ca. 14 %. Die gleiche Probe lieferte nach Dialyse nur 6,6 % Ausbeute, wovon 20 % der Proteasesequenz in der obigen Form und 80 % der neuen, von der Protease I vollkommen abweichenden Sequenz entsprachen. Zwei mögliche Erklärungen der Ergebnisse müssen in Betracht gezogen werden: 1) Die geringe Ausbeute bei beiden Proteasen könnte auf einem blockierten N-Terminus der Proteine beruhen. Die identifizierten Sequenzen würden demnach von stabilen Spaltprodukten stammen, da nach der SDS-PAGE (Abb. 8 und 10) keine sonstigen Verunreinigungen der Proteasepräparate zu erwarten waren. Unter der Voraussetzung, daß die Protease III als bisher größte gefundene Proteaseform die primäre Vorstufe mit dem endständigen N-Formyl-Methionin darstellt, war allerdings weder bei Protease I noch bei Protease II ein blockierter N-Terminus erwartet worden.

H_2N - Ala - Ala - Thr - Ser/Gly - Gly - Tyr - Asp - Ala_8 -

1 x 60 %, 2 x 80-90 % bei Prot. I; 3 x 20-30 % bei Prot. II

1 x 40 %, 2 x 10-20 % bei Prot. I; 3 x 70-80 % bei Prot. II

$_9$Val - Asp - (Arg)? - Leu - His - (Ser)? - Tyr - (Ser)? $_{16}$

$_{17}$Glu - Ser - Gly - Asn - Gly - Ile - Glu - Asn/Asp $_{24}$

$_{25}$?(Arg)- Thr - Lys - Asp - Phe - Ser_{30}

Abb. 16: N-terminale Aminosäuresequenz der Protease I- und Protease II-Präparate nach automatischem Edman-Abbau.

2) Wenn die geringe Ausbeute bei beiden Proteasen dem eingesetzten Material entspricht und somit die erhaltene Sequenz aus Abb. 16 mit H_2N-Ala-Ala-Thr-Gly... tatsächlich den N-Terminus von Protease I und II wiedergibt, dann sollten beide Proteasen N-terminal identisch sein. Die geringe Ausbeute könnte auf Materialverlust während der Aufarbeitung der Proben beruhen. Durch die Aufnahme und Dialyse der Proteasen in Ameisensäure wäre solches denkbar, zumal eine Eintrübung der Proben festgestellt wurde, und wie schon oben erwähnt wurde auch bei Dialysen (gegen Aqua dest.), während der Isolierung der Proteasen (und auch hier besonders bei Protese II) hohe Verluste aufgetreten sind. Auch ist die teilweise Unlöslichkeit und der Zerfall der Proteasen in hochkonzentrierter Ameisensäure und auch in sonstigen Lösungs- oder Denaturierungsmitteln beobachtet worden. Es ist auszuschließen, daß die völlig abweichende Sequenz des einen Protease II-Laufes tatsächlich den N-Terminus der Protease II darstellt, da in oder ab keiner Stelle der Sequenz eine Homologie zu der in Abb. 16 gezeigten Sequenz (beider Proteasen) festzustellen war. Vermutlich handelte es sich hier tatsächlich um den N-Terminus eines Spaltproduktes. Die aufgetretene Heterogenität ist unverstanden. Auffällig ist zwar das verstärkte Vorkommen der Ala-Ala-Thr-Komponente bei Protease I (meist

80 - 90 %) und das der Ala-Thr-Komponente bei Protease II (70 - 80 %), da aber im Protease I-Präparat nach anfänglich relativ hohem Anteil der kürzeren Ala-Thr-Form (40 %) nach einem Jahr Lagerung der gleichen Probe die längere Ala-Ala-Thr-Form (80 %) überwog, ist es fraglich, ob dies eine Protease-spezifische Erscheinung ist. Von einer Abspaltung des einen Ala-Restes kann nach dieser Beobachtung nicht ausgegangen werden.

Insgesamt gesehen bleibt der N-Terminus der beiden Proteasen unklar. Es ist nicht auszuschließen, daß beide Proteasen N-terminal blokkiert sind (in diesem Fall wäre ein Zusatzpeptid bei Protease II möglich, aber unwahrscheinlich gewesen). Es scheint aber wahrscheinlicher zu sein, daß beide Proteine, bis auf die Heterogenität bezüglich der ersten beiden Aminosäuren, identische N-Termini besitzen. Diese Vermutung wurde auch durch die im folgenden dargestellten Untersuchungen unterstützt.

3.3 Test der Freisetzung der Protease II durch Zellyse

Nach dem Edman-Abbau war zu vermuten, daß die Protease II den gleichen N-Terminus besitzt wie die Protease I, demnach kein Zusatzpeptid trägt und somit keine Vorstufe, sondern eventuell wie oben schon in Erwägung gezogen, eine zellgebundene (eventuell modifizierte) Proteaseform ist, die durch Lyse der Zellen freigesetzt wird. Eine ausgeschiedene nicht mehr vollständig "prozessierte" Proform kam bei nicht vorhandenem Signalpeptid nicht mehr in Frage (unter der Voraussetzung einer endständigen Signalsequenz). Um die Freisetzung der Protease II durch Zellyse zu testen, wurden Wildtypzellen (*S. marc.* ATCC 25419) und Zellen der Proteasemangelmutanten (*S. marc.* W831) bis zu 150 Std. in TY-Medium gezüchtet, in den verschiedenen Zellstadien Aliquots der Kulturen abzentrifugiert und das Wildtyppellet im Zellüberstand der Mutanten (aus gleichem Stadium) ca. 24 Std. lang weiterinkubiert. Die Freisetzung der Protease II wurde anhand der Proteaseaktivität in den Überständen der 24 Std.-Kulturen und mit Hilfe der SDS-PAGE getestet (der Mutantenüberstand wurde gewählt, um weitgehend identische Zuchtbedingungen beizubehalten. Inkubation in frischem Medium hätte durch Wachstum und aktive Enzymausscheidung das Ergebnis verfälscht). Bei der Inkubation der Wildtypzellen aus der logarithmischen Phase in Mutantenüberstand der gleichen Phase stieg, wie zu erwarten war, die Proteaseaktivität innerhalb der 24 Std. Inkuba-

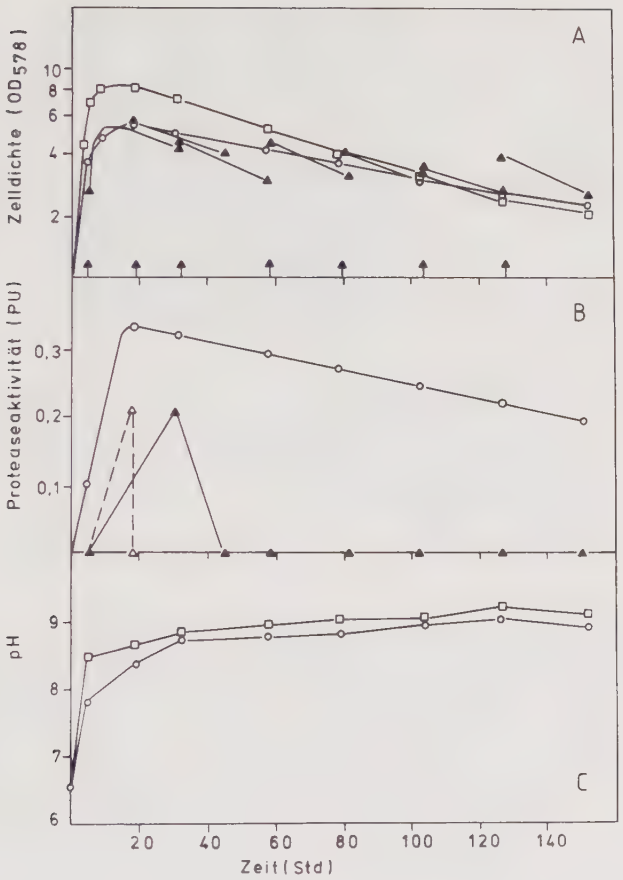

Abb. 17: Protease II-Freisetzungsexperiment. Zellen von S. marc. ATCC 25419 (WT) und S. marc. W831 (Prot.⁻) wurden in TY-Medium gezüchtet und in den in A durch Pfeile angezeigten Zeiten Aliquots der Kulturen abzentrifugiert und die Wildtypzellen im Mutantenzellüberstand ca. 24 Std. weiterinkubiert (30°C). Das Wachstum (A) und die Proteaseaktivität im Zellüberstand (B) der "24 Std.-Kulturen" wurde verfolgt. Die pH-Werte der beiden Kulturen während des Zellzyklus sind in (C) angegeben. Die gestrichelte Linie in (B) gibt den aus den in (A) und (B) gewonnenen Werten geschlossenen Proteasesekretionsstop wieder. Die Proteasemangelmutante zeigte keine Proteaseaktivität; der besseren Übersicht wegen ist dies in (B) nicht angegeben. Proteasemangelmutante (□), Wildtyp (○), Wildtyp in Mutantenzellüberstand (▲).

tion stark an und erreichte den gleichen Zuwachs wie die Kontrollkultur. Zellen aus der späten stationären Phase oder der Absterbephase zeigten aber im Mutantenüberstand weder Proteaseaktivität (Abb. 17) noch eine Proteasebande in der SDS-PAGE (nicht gezeigt). Eine passive Sekretion der Protease II durch Zellyse erfolgte demnach nicht. Da erst in der stationären Phase Protease II im Zellüberstand auftaucht und ihre Konzentration bis ca. zur Mitte der Absterbephase stark zunimmt (s. Abb. 1, 2), in dieser Zeit aber keine Protease durch Lyse freigesetzt wird, muß die Protease II im Zellüberstand entstehen. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, daß intrazellulär keine Proteaseform weder in der stationären noch in der Absterbephase unter normalen Wachstumsbedingungen nachweisbar war. Auf diese Untersuchungen wird später eingegangen (s. 3.6).

3.4 Versuche zum Nachweis der Entstehung der Protease II im Kulturüberstand

3.4.1 Einfluß des Mediums auf die Protease II-Bildung

Da die Zunahme der Protease II während der Absterbephase nicht auf Freisetzung des Proteins durch Zellyse beruhte, mußte angenommen werden, daß die Protease II durch Modifizierung der Protease I im Kulturüberstand entsteht. Die Inkubation eines sterilfiltrierten Zellüberstandes aus der stationären Phase des in TY-Medium gezüchteten Wildtypus mit hohem Protease I- und geringem Protease II-Gehalt (bei 30°) bis zu 312 Std. bewirkte, daß der Protease II-Gehalt (SDS-PAGE) langsam anstieg, während die Protease I-Konzentration bzw. Bandenstärke kontinuierlich abnahm. Die Umwandlung der Protease I in Protease II erfolgte demnach auch in reinem Zellüberstand, war aber im Vergleich zur Gesamtkultur langsamer, weniger drastisch und nicht vollständig (Daten nicht gezeigt).
Um den Beweis zu erhalten, daß die Protease II tatsächlich aus der Protease I entsteht und ob und welche Faktoren des Mediums dazu nötig sind, wurden die folgenden Versuche mit den gereinigten Proteasen durchgeführt. Bei Inkubation der Protease I und II in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 (30°C bis zu 312 Std.) konnte zwar die Abnahme der Bandenstärke mit Zunahme der Inkubationszeit und das Auftreten von Spaltprodukten, die teilweise den Größenunterschied (1.000 D) der Ausgangsproteine aufwiesen, nicht aber eine Umwandlung der Protease I in II festgestellt werden. Erfolgte

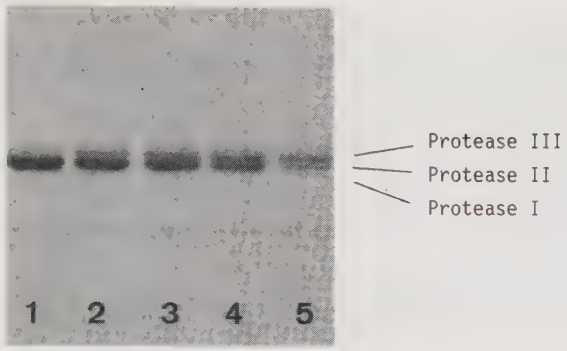

Abb. 18: Umwandlung der Protease I in Protease II und III in Proteasemangelmutantenüberstand. Protease I wurde in sterilfiltriertem Zellüberstand von einer bis in die späte stationäre Phase in TY-Medium gezüchteten S. marc. W 831-Kultur 0 Std. (1), 24 Std. (2), 48 Std. (3), 96 Std. (4) und 192 Std. (5) bei 30°C inkubiert. Die Menge der Überstände, die 5 µg der Ausgangskonzentration entsprach, wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt.

die Inkubation der Protease I im Überstand der Proteasemangelmutante (gewonnen aus der stationären oder Absterbephase), so wurde eine deutliche Umlagerung der Protease I in II sichtbar. Diese war zwar innerhalb der 192 Std. Inkubation nicht vollständig, aber es lag ungefähr doppelt so viel Protease II wie I vor, wobei der Gesamtproteingehalt während der Inkubation aufgrund der Autolyse abgenommen hatte (Protease I und II zeigen identisches Autolyseverhalten, nicht gezeigt). Auch wurde nach 192 Std. eine schwache Protease III-Bande entdeckt (Abb. 18).

Aus den Inkubationsexperimenten war zu schließen, daß die Proteasen II und III im Kulturüberstand entstehen und ein Faktor des Mediums eine Rolle spielt. Die Anwesenheit der Zellen ist hierzu nicht nötig. Die Protease II geht aus der Protease I hervor und wird ihrerseits wieder (allerdings in weit geringerem Ausmaß) in Protease III umgewandelt.

3.4.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Protease II-Bildung

Die Protease I wurde durch Inkubation im Zellmedium (pH > 8) nicht aber im Tris/HCl-Puffer pH 8 in die Protease II umgelagert. Demnach mußte ein Faktor des Mediums eine Rolle spielen. Bei den obigen Inkubationsexperi-

menten lagen unterschiedliche pH-Werte vor, weshalb der Einfluß des pH's auf die Protease II-Bildung getestet wurde. Aus Abb. 17 geht hervor, daß der pH der in TY-Medium gezüchteten Wildtypkultur während des logarithmischen Wachstums von pH 6,6 (0 Std.) auf ca. pH 8 ansteigt (5 Std.). Bis zum Ende der stationären Phase erfolgt eine weitere Erhöhung bis ph 8,4 und während der Absterbephase anfänglich stärker, gegen Ende langsamer bis zu pH 9. Bei der Proteasemangelmutante ist der pH-Anstieg etwas stärker und erfolgt früher, da schon zum Ende der Log-Phase ein pH von 8,5 vorliegt. Die Züchtung der Zellen in TY-Medium hat also eine starke Alkalisierung des Zellüberstandes um ca. 2,4 pH-Einheiten von pH 6,6 auf pH 9 zur Folge. Da die Protease II erst nach der Log-Phase auftaucht, sollte, wenn überhaupt, ein alkalischer pH größer 8 einen Einfluß auf ihre Entstehung haben, was auch aus dem Ergebnis der oben erwähnten Experimente zu schließen wäre (Abb. 18: pH ca. 8,6). Nach 48 Std. Inkubation der Protease I und II, gelöst in verschiedenen Puffers, bei 30°C, war ein deutlicher pH-Effekt festzustellen (Abb. 19). Die Protease I spaltete ab pH 8 auf und lag bei pH 9 deutlich als Doppelbande (Protease I und II) vor. Bei pH 11 war bei beiden Proteasen keine Proteinbande mehr zu erkennen, was auf Autolyse und wohl auch alkalische Hydrolyse zurückzuführen ist. Die Protease II blieb insgesamt unverändert, zeigte aber bei direktem Auftrag (ohne vorherige Titration auf pH 7) eine leichte Aufspaltung in die Protease III bei pH 9. Die "Modifizierung" der Protease I ist irreversibel, was durch Titration auf pH 7 vor Auftrag der Proben im Gel gezeigt werden konnte (Abb. 25A). Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment, bei dem Protease I, II und ein Gemisch beider in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,8 bis zu 192 Std. inkubiert wurden, bestätigt werden. Die Protease I ging hierbei sofort in Protease II über und nach 192 Std. lagen beide Proteine in gleicher Bandenstärke vor. Die Protease II blieb unverändert, eine Protease III-Bande war nicht zu erkennen. Beim Proteasegemisch war nach 192 Std. die Protease II-Bande dominant (nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die Protease I im Kulturüberstand aufgrund der Alkalisierung des Mediums in die Protease II umgewandelt wird, aus der wiederum, aber in geringerem Maße, die Protease III entsteht. Obwohl die Umwandlung der Protease I in den obigen Experimenten nicht wie zumindest teilweise in der Gesamtkultur vollständig war (z.B. Abb. 2) (was auf konstanten pH zurückgeführt wird), muß der Einfluß anderer Mediumsfaktoren bzw. eine Modifizierung (z.B. Glykosy-

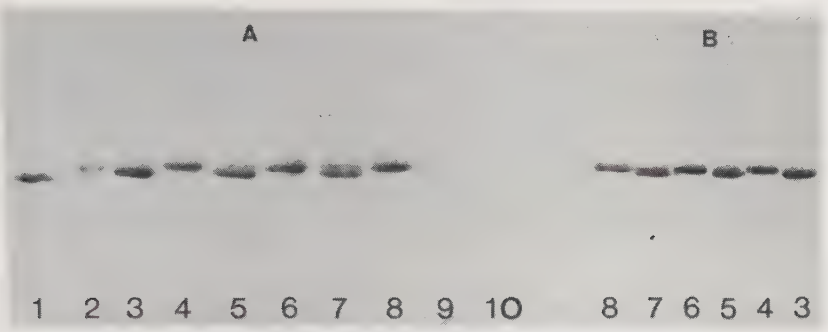

Abb. 19: Effekt des pH-Wertes auf die Protease II-Bildung. Je 5 µg Protease I (1, 3, 5, 7, 9) und je 5 µg Protease II (2, 4, 6, 8, 10) wurden in 50 mM Acetatpuffer pH 5 (1, 2), in 50 mM Tris/HCl-Puffer ph 7 (3, 4), pH 8 (5, 6) und pH 9 (7, 8) und in 50 mM Glycinpuffer pH 11 (9, 10) 48 Std. bei 30°C inkubiert, die Proben dann nach Titration auf pH 7 (A) oder ohne vorherige Titration (B) in der SDS-PAGE aufgetrennt.

lierung) ausgeschlossen werden, da die Entstehung der Protease II aus reiner Protease I in reinem Tris/HCl-Puffer ab pH 8 gezeigt werden konnte. Die innermolekulare Umstrukturierung der Proteasen in die jeweils in der SDS-PAGE höhermolekular laufende Form könnte am einfachsten mit der Desaminierung von Glutamin und Asparagin bei alkalischem pH erklärt werden. Die Entstehung von Glutamin- bzw. Asparaginsäure und der damit einhergehende stärkere saure Charakter der Proteine, der auch während der Isolierung festgestellt wurde, könnte das abnormale Laufverhalten in der SDS-PAGE verursachen.

3.4.3 Einfluß der Temperatur auf die Protease II-Bildung

Die Protease I und II sind nicht, wie einige der Proteine der äußeren Membran von *E. coli* (35) oder *S. marcescens* (51), hitzemodifizierbar, sondern zeigen nach Auftrag in der SDS-PAGE mit und ohne vorheriges Kochen im SDS-Mix identisches Laufverhalten (Abb. 20A). Werden die Proteine allerdings in Aqua dest. oder in 10 mM Tris/HCl pH 8 auf 95°C erhitzt und anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt, so sind folgende Effekte festzustellen: Die Proteasen zeigen schon nach 5 Min. Inkubation

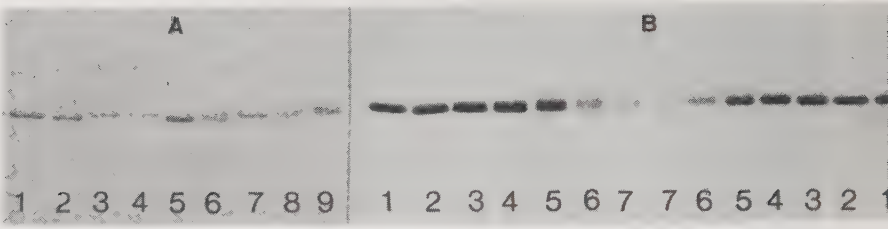

Abb. 20: Einfluß der Temperatur auf die Protease II-Bildung.
A: Protease I (1, 2, 5, 6) und Protease II (3, 4, 7, 8, 9), in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 gelöst, wurden in Elektrophoresemix ohne Kochen (1, 3) oder nach Kochen (2, 4) in der SDS-PAGE aufgetrennt (je 1 µg). Je 10 µg der Proteasen wurden 5 Min. (5, 7) und 30 Min. (6, 8, 9) auf 95°C erhitzt, dann in Elektrophoresemix gekocht und die gesamte Proteinmenge in der SDS-PAGE getrennt. Die gleichen Bandenmuster wurden auch mit in aqua dest. gelösten Proteasen erhalten.
B: Je 5 µg der Protease I und II, in aqua dest., wurden in Anwesenheit von O-Phenanthrolin (9,5 mM) bei 95°C 0 Min. (1), 5 Min. (2), 15 Min. (3), 30 Min. (4), 60 Min. (5), 2,5 Std. (6) und 5 Std. (7) inkubiert und jeweils die gesamte Proteinmenge in der SDS-PAGE aufgetrennt. Links: Protease I, rechts: Protease II.

bis zu 90 % Materialverlust (Abb. 20A). Dieser muß zumindest teilweise auf Autolyse (obwohl die Erhitzung schlagartig erfolgte) zurückzuführen sein, da er durch Zugabe des Proteasehemmstoffes Orthophenantrolin (OPA) zumindest bis zu 1 Std. fast vollständig verhindert werden kann (Abb. 20B). Zum Teil muß Hydrolyse angenommen werden, da trotz OPA-Zugabe Kochen über 1 Std. lang starke Bandenverringerung zur Folge hat. Das Kochen der Protease I mit oder ohne OPA bewirkt mit Zunahme der Inkubationszeit die Entstehung der Protease II. Die Protease II blieb meistens unverändert, manchmal war die Aufspaltung in Protease III zu erkennen (Abb. 20A, Spalte 9). Somit bewirkt die Erhitzung der Protease I auf 95°C, unabhängig vom pH-Wert, eine Umwandlung in die Protease II, wobei nach ca. 1 Std. das Verhältnis 1:1 ist. Da dies auch während der Inhibition der Proteasen erfolgt, muß ein proteolytischer Prozeß bei der Entstehung der Protease II ausgeschlossen werden. Dieser hätte nur durch die Protease I selbst erfolgen können, wie das Inkubationsexperiment in Puffer ergab und war auch nicht zu erwarten, da die beiden Proteasen C-terminal und vermutlich N-terminal gleiche Aminosäuresequenzen aufweisen. Auch hier

könnte die Entstehung der Protease II (und III) durch Erhitzen auf 95°C mit der Hydrolyse der Aminosäureamide (Gln und Asn) erklärt werden.

3.5 Zwischenbilanz

In der Absterbephase von S. marcescens ATCC 25419 wurde neben der in der log-Phase ausgeschiedenen Exoprotease I, die nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese um 1.000 D höhermolekulare Protease II entdeckt. Aufgrund ihres größeren Molekulargewichtes und ihrer immunologischen Verwandtschaft zu Protease I wurde der Vorstufencharakter dieses Proteins untersucht. Die Protease II konnte über Anionenaustauschchromatographie von der Protease I getrennt und rein isoliert werden, wobei bei einer Isolierung auch noch die Protease III, die eine um ca. 1.000 D höhermolekulare Bande als die der Protease II in der SDS-PAGE ergab, entdeckt wurde. Die Protease I und II zeigten in den getesteten Eigenschaften identisches Verhalten: Gleiche Aminosäurezusammensetzung, gleiche spezifische Aktivität, immunologische Identität, identisches Autolyseverhalten und gleiche pH-Abhängigkeit. Durch Sequenzanalysen konnte der Proformcharakter der Protease II nicht bestätigt werden. C-terminal lag eindeutig eine mit der Protease I identische Aminosäuresequenz vor, N-terminal waren die Ergebnisse schwer auswertbar, ließen aber identische Sequenz vermuten. Für den gleichen N-Terminus und damit gegen den Proformcharakter der Protease II sprachen die Inkubationsexperimente mit Zellkulturen und mit den reinen Proteasen im Medium oder Puffer. Es konnte gezeigt werden, daß die Protease II nicht durch Zellyse freigesetzt wird, sondern aufgrund der Alkalisierung des Mediums aus der Protease I im Überstand entsteht. Gleiches gilt für die Protease III, die allerdings in geringerem Maße aus der Protease II hervorgeht. Die aus der SDS-PAGE abgeleiteten Größenunterschiede der Proteine sind demnach auf abnormales Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und nicht auf zusätzliche Aminosäuresequenzen, die Signalpeptiden von Vorstufen entsprächen, zurückzuführen. Da die Protease II und III demnach keine Rolle im Sekretionsmechanismus der Protease I spielen, wurde auf weitere Untersuchungen mit diesen Proteinen verzichtet.

3.6 Suche nach einer zellgebundenen Proteasevorstufe unter normalen Wachstumsbedingungen

Alle Versuche, unter normalen Wachstumsbedingungen zellgebundene Protease oder Proteaseproform(en) zu finden, schlugen fehl. Zellextrakte, die durch French-press-Aufschluß der Zellen von S. marc. ATCC 25419 (WT) und S. marc. W 831 (Prot$^-$) aus den verschiedenen Zellstadien (in TY-Medium gezüchtet wie z.B. in Abb. 1) gewonnen wurden, enthielten kein immunpräzipitierbares Material. Die Zellysate (je 500 µg) wurden hierbei, wie in 2.6.1 beschrieben nach Zentrifugation der unlöslichen Teile oder nach Kochen in 1 % SDS (Lösen der Membranproteine) einer Immunfällung unterzogen. In der anschließend durchgeführten SDS-PAGE waren keine Proteinbanden zu erkennen (weshalb auf die Darstellung verzichtet wird). Auch im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest konnte kein Antigen aus Zellextrakten nachgewiesen werden. In früheren Untersuchungen war schon dargestellt worden, daß während der aktiven Proteasesekretion keine bzw. minimal intrazelluläre Proteaseaktivität vorlag (17). Mit Beginn der Absterbephase konnte allerdings ansteigende intrazelluläre Proteaseaktivität in der löslichen Fraktion beim Wildtyp und mehreren Proteasemangelmutanten nachgewiesen werden. Trotz Einsatz von Überständen und Zellextrakten mit ungefähr gleich hoher Proteaseaktivität konnte nur aus dem Zellüberstand (WT), nicht aber aus den Zellextrakten Antigen (Protease) ausgefällt werden (Abb. 21). Somit scheint die intrazelluläre Proteaseaktivität nicht von der Exoprotease oder deren Vorstufe(n) herzurühren und zumindest die Protease-defiziente Mutante W 831 (und wahrscheinlich auch alle früher getesteten Mutanten) scheint keine Sekretions- sondern eine Synthesemutante zu sein.

Die obigen Versuche wurden durch Markierungsexperimente mit dem Wildtyp und der Proteasemangelmutante während der frühen Log-Phase (vor der Hauptproteasesekretion), während der späten Log-Phase (maximale Sekretion) und während der Absterbephase (keine Sekretion, aber intrazelluläre Aktivität) bestätigt. Die mit ^{14}C-Aminosäuren in TY-Medium markierten Kulturen (Markierungsdauer 1 Std. und länger, s. 2.16.4.2) wurden sedimentiert und die Zellen nach Aufschluß durch Kochen in SDS und die entsprechenden Zellüberstände durch Immunfällung auf Antigengehalt geprüft. In der sich anschließenden SDS-PAGE und Autoradiographie wurde außer der Protease im Zellüberstand des Wildtyps aus der Sekretionsphase kein mit

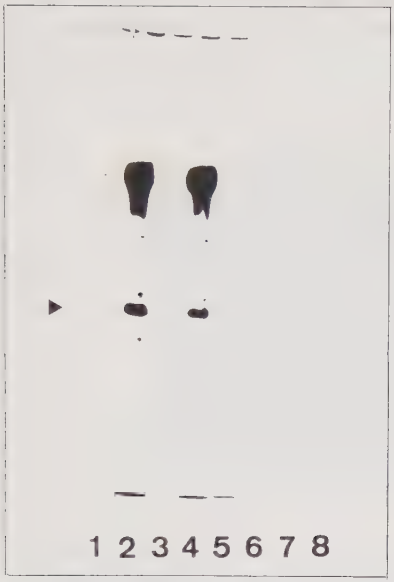

Abb. 21: Immunfällung aus Zellüberstand und Zellextrakten des Wildtyps der Proteasemangelmutante. Zellen von S. marc. ATCC 25419 und S. marc. W 831 wurden nach 17 Std. (Ende log-Phase) und 119 Std. (Absterbephase) in der Frenchpress aufgeschlossen (s. 2.6.1) und nach Zentrifugation der unlöslichen Teile je 0,3 ml mit Antiserum gefällt. Von den Zellüberständen wurden je 0,1 ml immunpräzipitiert (Immunfällung nach 2.11.3.1). In der sich anschließenden SDS-PAGE wurde jeweils die gesamte Probenmenge aufgetrennt. Immungefällte Zellüberstände (Ü): Mu-Ü 17 Std. (1), 119 Std. (3), WT-Ü 17 Std. (2), 119 Std. (4), Zellextrakte (E): Mu-E 17 Std. (5), 119 Std. (7), WT-E 17 Std. (6), 119 Std. (8). Immungefällte Aktivitäten: WT-Ü 17 Std.: 4×10^{-2} PU (2), WT-Ü 119 Std.: $2{,}5 \times 10^{-2}$ PU (4), Mu-E 119 Std.: $5{,}1 \times 10^{-2}$ PU (7), WT-E 119 Std.: $4{,}7 \times 10^{-2}$ PU (8). Alle anderen Proben zeigten keine Aktivität. Der Pfeil gibt die Protease I-Position an. Alle übrigen Proteine stammen vom Antiserum.

Antiserum ausfällbares Material entdeckt. Somit konnte auch nach radioaktiver Markierung in keinem Zellstadium zellgebundenes Antigen nachgewiesen werden. Eine permanente oder temporäre Proteaseform scheint demnach nicht vorzuliegen.

Auch kurzzeitige radioaktive Markierung, die bei verschiedenen sekretorischen Proteinen von E. coli eine Proform nachweisen ließ (66, 67), gelang für die Protease nicht. In einem "pulse-chase"-Versuch wurden spätlogarithmische, in TY-Medium gezüchtete Zellen von S. marc. ATCC 25419 5 Sek. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch markiert und der "chase" in Anwesenheit unmarkierter Aminosäuren bis zu 2 Min. durchgeführt. Die Zellextrakte und -überstände wurden wie oben mit Hilfe der Immunfällung und der SDS-PAGE auf Antigengehalt getestet. Nach nur 5 Sek. Pulsmarkierung war kein Antigen aus dem Zellextrakt, wohl aber Protease I aus dem Zellüberstand fällbar (Abb. 22). Somit scheint ein Sekretionsmechanismus

vorzuliegen, bei dem die Synthese und der Export (bis in das Medium) ein sehr rascher und gleichzeitig gekoppelter Prozeß ist. (Trotz des Überschusses an unmarkierten Aminosäuren kam es während des "chase" zur Protease-Neusynthese (Zunahme der Bandenstärke), was aber die Auswertung des Experiments nicht störte).

Abb. 22: "Pulse-chase"-Versuch (Autoradiogramm 4 Wo.). Spätlogarithmische Zellen von S. marcescens ATCC 25419, in TY-Medium, wurden 5 Sek. mit ^{14}C-Aminosäuren (TO µCi/1,8 x 10^9 Zellen) pulsmarkiert. Der "chase" wurde durch Zugabe von unmarkierten Aminosäuren (0,33 mg/ml) eingeleitet und mit doppeltem Volumen Eis nach 0, 5, 30 und 120 Sek. gestoppt. die Zellen (1,8 x 10^9) wurden nach Sedimentation und TCA-Fällung in SDS gekocht und wie die entsprechenden Zellüberstände nach 2.11.3.2 immungefällt. Eine SDS-PAGE und Autoradiographie schloß sich an. Protease I-Marker (1), Zellextrakte (2, 4, 6, 8), Zellüberstände (3, 5, 7, 9), "chase"-Intervalle, von links nach rechts: 0, 5, 30, 120 Sek.

3.7 Versuch der Anreicherung eines Proteasevorläufers in der Cysteinmangelmutante

Aus den bisherigen Daten ging hervor, daß die Exoprotease weder aus einer permanent oder temporär angehäuften Vorstufe hervorgeht, noch selbst (als reife Form) in nachweisbarer Menge zellgebunden vorliegt. Somit mußten, um eine Vorstufe(n) (oder das reife Protein) intrazellulär nachweisen zu können, Bedingungen gefunden werden, die den Synthese- und Exportschritt entkoppeln. Hierzu sollte das Fehlen von Cystein und Methionin in der Po-

peptidkette des Enzyms ausgenutzt werden. Die Zucht der Protease-sekretierenden Cystein-auxotrophen S. marcescens-Mutante EN 6 in Cysteinfreiem Medium sollte, da die Synthese Cystein-haltiger Proteine nicht mehr möglich ist, in einer bevorzugten Synthese der Cystein-freien Proteine und somit auch der Exoprotease resultieren. Dies könnte eine Akkumulation der Protease oder deren Proform in der Zelle aufgrund einer verzögerten Sekretion (bei Überproduktion mit der Sekretion als limitierenden Schritt) hervorgerufen oder sogar den Sekretionsstop bewirken, entweder aus dem gleichen Grund oder möglicherweise, weil die für die Sekretion benötigten Proteine (Cystein-haltig) nicht mehr nachgeliefert werden.

3.7.1 Wachstum und Proteaseausscheidung

Um die Proteasesynthese der Cysteinmangelmutante unter Cystein- und Cystein und Methionin-Mangel zu testen, wurden folgende Zuchtbedingungen gewählt: Als Induktionsmedium diente ein mit den 20 Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und Mineralstoffen angereichertes Glycerolbasalmedium (AS-GBM) wie in 2.2 beschrieben. Die Zellen wurden in diesem Medium bis zum Ende der logarithmischen Phase (höchste Sekretion) gezüchtet, einmal in GBM ohne Zusatz gewaschen (RT) und anschließend im obigen Medium (AS-GBM), dem aber Cystein (AS-GBM ohne Cys) oder Cystein und Methionin (AS-GBM ohne Cys + Met) fehlte, weiterinkubiert. Aus Abb. 23 geht hervor, daß der Transfer wie erwartet den Wachstumsstop zur Folge hatte.
In der gleichen Abbildung sind die Aktivitätskurven (Zellüberstand) angegeben. Die Kontrollkultur (Aufnahme der gewaschenen Zellen in AS-GBM) erreichte nach 2 Std. Inkubation gemäß dem Zellwachstum ihren maximalen Aktivitätswert, der dem Maximum der Ausgangskultur entsprach. In Cysteinfreiem GBM wurde ebenfalls Protease ausgeschieden, wobei die höchsten Werte nach 6 - 10 Std. gemessen wurden und um ca. 1|3 höher waren als die der Kontrollkultur. Selbst unter Cys + Met-Mangel konnte die Mutante noch Protease synthetisieren, wobei auch hier nach 6 - 10 Std. das Aktivitätsmaximum erreicht wurde, das fast so hoch wie das der Kontrolle lag. Die Proteinsynthese selbst unter Cys + Met-Mangel setzt voraus, daß entweder noch genügend S-haltige Aminosäuren intrazellulär vorlagen und/oder, da die Proteasesekretion langsamer und über einen längeren Zeitraum als bei

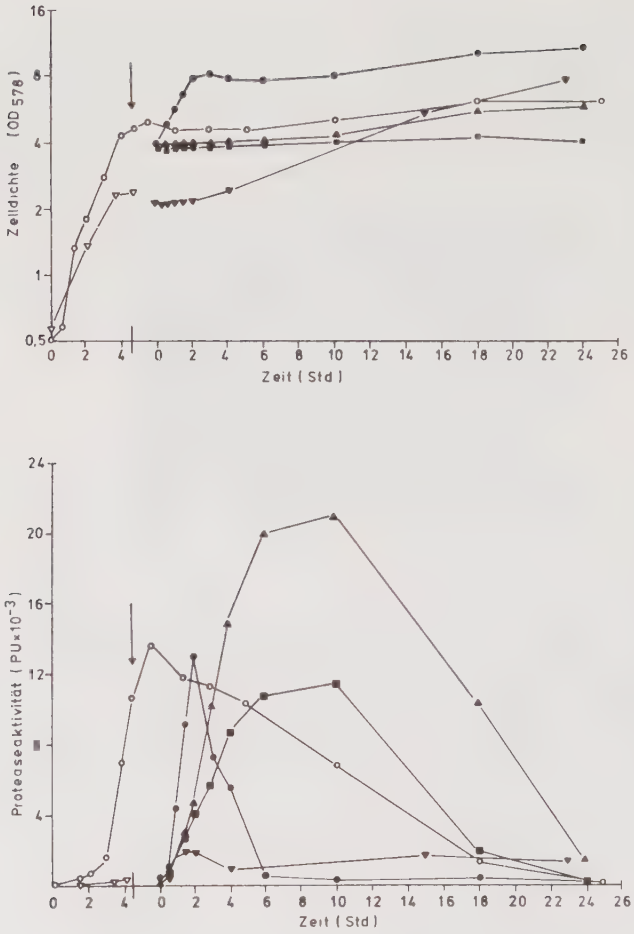

Abb. 23: Wachstum und Proteasesekretion der Cystein-auxotrophen Mutante unter Cysteinmangelbedingungen. Zellen von S. marc. EN 6 wurden in mit 20 AS angereichertem GBM (AS-GBM) bis zum Ende der log-Phase bei 30°C gezüchtet. Ein Aliquot der Zellen wurde nach Waschen (in AS-freiem GBM; Zeitpunkt durch Pfeil angezeigt) in Cystein oder Cystein und Methionin-freiem AS-GBM weitergezüchtet. Das Zellwachstum (A) und die Proteaseaktivität im Zellüberstand (B) wurde bis zu 24 Std. lang verfolgt. In AS-GBM vorgezüchtete Kultur (o) nach Waschen in AS-GBM (●), in AS-GBM ohne Cys (▲) und in AS-GBM ohne Cys + Met (■) weiterinkubiert. Kultur im AS-haltigen GBM ohne Vitamine (▽), nach Waschen im AS-haltigen GBM ohne Vitamine (▼).

der Kontrolle erfolgte, durch Proteinturnover zur Verfügung stand. Somit ist die Cystein-auxotrophe Mutante in der Lage unter Cystein- und Methioninmangel noch Exoprotease zu synthetisieren und auszuscheiden. Hierzu ist Zellwachstum nicht nötig. Die im Vergleich zur Kontrolle hohen Aktivitätswerte und die längere Sekretionsdauer (bis zu 10 Std.) ohne Zusatz der S-haltigen Aminosäuren deuteten auf eine spezifische Proteasesynthese hin.
Insgesamt war das Zellwachstum und besonders die Proteasesekretion (oder Synthese) im AS-GBM geringer als in dem gut induzierenden TY-Medium. Die maximal erreichte Proteaseaktivität betrug im Kontrollüberstand ca. 4,3 % (3 %), in AS-GBM ohne Cys ca. 7 % (9 %) und im AS-GBM ohne Cys + Met ca. 3,8 % (5,2 %) des durchschnittlichen Maximalwertes aus Zellüberstand des Wildtyps in TY-Medium, wobei die jeweils in Klammer angegebene Prozentzahl der Proteaseaktivität/Zelldichte entspricht. Aus Abb. 23 geht auch hervor, daß die Zugabe von Vitaminen, Spurenelementen und Mineralstoffen zu dem Aminosäure-haltigen GBM eine Wachstumssteigerung und besonders eine erhöhte Proteaseaktivität zur Folge hatte. Pro Zellzahl wurde in Vitaminhaltigem Medium ca. 5mal (AS-GBM ohne Cys) bzw. ca. 3,75mal (AS-GBM ohne Cys + Met) mehr Protease ausgeschieden als im gleichen Medium ohne Vitaminzugabe.

3.7.2 ^{35}S-Methionin-Markierung

Die intrazelluläre Anhäufung einer Proteaseproform unter den Cysteinmangelbedingungen wurde durch ^{35}S-Methioninmarkierung der Cystein-auxotrophen Mutante in AS-GBM ohne Cys + Met geprüft (es wurde nicht im AS-GBM ohne Cys inkubiert, da die ^{35}S-Met-Aufnahme nur 10 % der eingesetzten Radioaktivität betrug). Nach dem Transfer der Zellen aus dem AS-GBM in das Cys + Met-freie GBM wurde innerhalb von 5 Min. im Durchschnitt 70 % der eingesetzten Radioaktivität von den Zellen aufgenommen und innerhalb von 30 Min. in zelluläre Proteine eingebaut. Das radioaktive fällbare Material stieg von anfänglich 0,6 % (nach 1 Min.) innerhalb von 6 Std. auf ca. 2,5 % der eingesetzten Radioaktivität an. Ähnliche Werte wurden auch bei einstündiger Markierung nach 2 oder 3 Std. im AS-GBM ohne Cys + Met erhalten. Dies bedeutet, daß nur ein Bruchteil der ^{35}S-Methionin-haltigen Proteine in das Medium ausgeschieden werden. Die hohe Einbaurate des ^{35}S-Methionin in zelluläre Proteine lag nicht an einer spezifischen Synthese

eines Proteasevorläuferproteins: Mutantenzellen wurden nach 3 Std. Inkubation im AS-GBM ohne Cys + Met 1 Std. mit ^{35}S-Methionin markiert und anschließend mit Lysozym/EDTA aufgeschlossen und die Membranfraktion und die lösliche Fraktion auf Antigengehalt geprüft. Nur die Proteaseproform, mit N-Formyl-Methionin am N-Terminus, sollte im Autoradiogramm geschwärzt erscheinen und somit von der reifen Form, die kein Methionin enthält, zu unterscheiden sein (unabhängig von Größenunterschieden). Der Auftrag der löslichen und Membranfraktion in der SDS-PAGE und die anschließend durchgeführte Autoradiographie ergaben, daß das gesamte Proteinmuster beider Fraktionen markiert war. Weder aus der löslichen noch aus der Membranfraktion konnte Protease oder eine Vorstufe immunpräzipitiert werden (auch keine Bande im gefärbten Gel) (Abb. 24). Auch im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest wurden bei Diffusion von löslicher oder Membranfraktion gegen Antiserum keine Präzipitationslinien ausgebildet. Somit wurde in der Cystein-auxotrophen Mutante durch Cystein- und Methioninmangel intrazellulär keine Proform angereichert.
Die Einbaurate des ^{35}S-Methionin in Proteine des Zellüberstandes sollte demnach der Syntheserate entsprechen, so daß die Exoprotease, unter diesen Bedingungen, weniger als 3,5 % der Gesamtproteine der Zelle ausmacht. Die Immunfällung mit dem Zellüberstand einer wie oben markierten Kultur ergab, daß zwei radioaktiv markierte Proteine durch Antiserum ausfällbar waren. Hiervon lief das eine Protein in der SDS-PAGE in der Position der Protease I, das andere in der Position der Protease III. Das Auftreten der beiden Proteinbanden unter Cysteinmangelbedingungen war reproduzierbar, allerdings schwankte hierbei das Verhältnis der Konzentration und parallel hierzu der Bandenschwärzung (^{35}S-Met-Einbau) der beiden Proteine. Das höhermolekulare Protein lag meistens in geringer Konzentration vor und fehlte manchmal ganz. Da die Exoprotease nach Aminosäureanalyse kein Methionin enthielt, gab es 2 mögliche Erklärungen: 1) Die Exoprotease war von einem Methionin-haltigen Protein überlagert (wogegen die Immunpräzipitierbarkeit sprach) und das um 2.000 D höhermolekulare Protein (nach der SDS-PAGE) war die Proform, die unter diesen deregulierten Bedingungen freigesetzt wurde. 2) Die Exoprotease enthält Methionin. Dann konnte die höhermolekulare Form auch eine "modifizierte" (reife) Protease sein bzw. die Protease III.

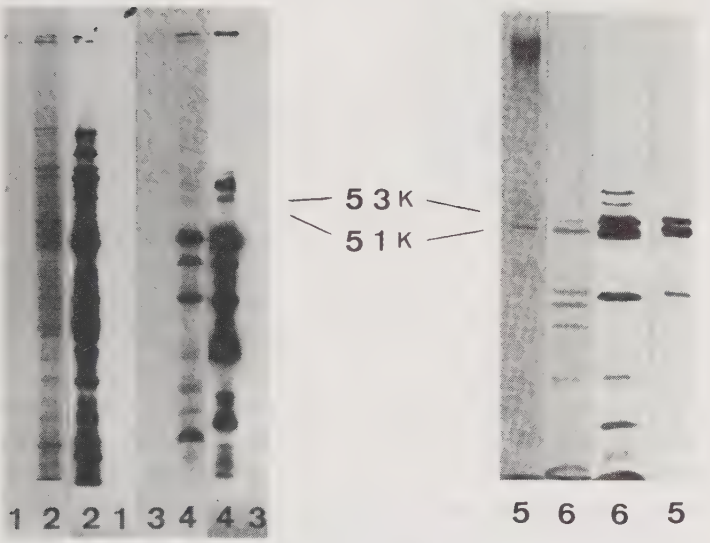

Abb. 24: Test der Cysteinmangelmutante auf Proformanreicherung in AS-GBM ohne Cys + Met. Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen 1 Std. lang mit ^{35}S-Methionin (1 µCi/ml) markiert. Der Zellüberstand und die nach Zellaufschluß mit EDTA/Lysozym gewonnene Membran- und lösliche Fraktion wurden mit Antiserum gefällt (2.16.2.1) und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Weiterhin wurden Aliquots des Zellüberstandes (nach Äthanolfällung) und der Zellfraktionen (nach Kochen im Elektrophoresemix) direkt in der SDS-PAGE eingesetzt. Coomassieblau-Färbung (jeweils linke Spalten), Autoradiographie (3 T., jeweils rechte Spalten), lösliche Fraktion: Immunpräzipitat (100 µg) (1), direkt (50 µg) (2); Membranfraktion: Immunpräzipitat (100 µg) (3), direkt (25 µg) (4); Zellüberstand: Immunpräzipitat (0,7 ml) (5); Äthanolfällung (0,7 ml) (6). Molekulargewichtsangabe in Einheiten von Tausend (K = Kilo) 51 K = Protease I, 53 K = Protein III (auch bei Immunfällungen aus der Membranfraktion mit 400 µg Protein oder der löslichen Fraktion mit 600 µg Protein war kein Antigen zu entdecken).

3.7.3 Versuche zum Nachweis von Methionin und Cystein in der Exoprotease

3.7.3.1 Bromcyanspaltung

Wiederholte Aminosäureanalysen mit vorangehender Perameisenoxidation (Umwandlung des Methionin in sein stabiles Sulfonderivat und des Cystein in Cysteinsäure) lieferten keinen Hinweis auf Cystein oder Methionin in der Polypeptidkette der Exoprotease. Da nur ein sehr geringer Prozentsatz dieser Aminosäure zu erwarten war, konnte dieses Ergebnis an der Ungenauigkeit der Meßmethode liegen. Auch war nicht auszuschließen, daß das Methionin im danebenliegenden, sehr großen Asparagingipfel verschwand, weshalb der Methioningehalt mit Hilfe der Bromcyanspaltung überprüft wurde. Bei der Reaktion mit Bromcyan werden diejenigen Peptidbindungen gespalten, deren Carbonylfunktion Methionin-Einheiten angehören. Somit kann aufgrund der Bildung von Spaltprodukten der Gehalt an Methionin innerhalb einer Polypeptidkette (annähernd) bestimmt werden. Die Spaltung der Exoprotease mit Bromcyan lieferte in der SDS-PAGE neben der Protease selbst zwei neue Proteinbanden, die weder in der Kontrolle (Behandlung wie die Probe, aber ohne Bromcyanzusatz) noch bei der unbehandelten Protease (lyophiliserte Probe) vorkamen (Abb. 25A). Deshalb kann angenommen werden, daß es sich hierbei um durch Bromcyan entstandene Spaltprodukte der Exoprotease handelt. Da die Summe der Molekulargewichte der beiden Spaltprodukte (26.500 und 24.000 Dalton) genau dem Molekulargewicht der Exoprotease entspricht (das in der SDS-PAGE aus Abb. 25 50.500 Dalton betrug), kann davon ausgegangen werden, daß die Exoprotease zumindest einen Methioninrest und zwar ungefähr in der Mitte des Moleküls enthält.

Die unvollständige Spaltung des eingesetzten Materials (Abb. 25A, Spalte 3) konnte nicht nur auf teilweise Oxidation der Schwefelgruppen zur Sulfoxid- oder Sulfongruppe zurückgeführt werden, da bei in Anwesenheit von Mercaptoessigsäure (als Reduktionsmittel) durchgeführter Bromcyanspaltung ebenfalls ungespaltenes Protein (in Proteaseposition) zurückblieb. Bei Aufnahme der Protease in Ameisensäure (80 proz.) blieb ein Teil ungelöst, so daß vermutet wird, daß die Protease, die in der SDS-PAGE zu erkennen ist, erst im Elektrophoresemix in Lösung ging. Auch bei der Kontrollprobe fiel auf, daß nur ein Teil des Proteins in der SDS-PAGE wieder-

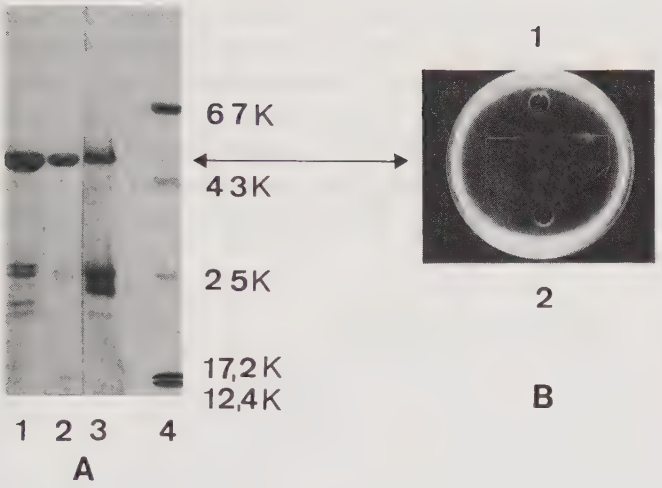

Abb. 25: Bromcyanspaltung.
A: Exoprotease wurde wie in 2.9.3 beschrieben mit Bromcyan (ohne Mercaptoessigsäure) gespalten und nach Lyophilisation die Menge in einer SDS-PAGE aufgetrennt, die 100 µg der Ausgangskonzentration entsprach (3). Vom Kontrollansatz (ohne Bromcyan) wurde ebenfalls 100 µg (2) und von der unbehandelten Exoprotease 50 µg (1) im Gel aufgetragen (Eichproteine wie 2.10.1 angegeben. Molekulargewichtsangabe (Dalton) in Einheiten von Tausend (K = Kilo) (4).
B: Die Bromcyanspaltung mit anschließender SDS-PAGE wurde wie in A durchgeführt und der Gelabschnitt im Proteasebereich (Bestimmung durch Coomassie-Färbung der Kontrollprobe) im Ouchterlony-Diffusionstest bei Einsatz von 20 µl (1) und 40 µl (2) Antiserum auf Antigengehalt geprüft. Der Pfeil zeigt die Position der Exoprotease an.

gefunden wurde, so daß wohl auch ein Teil des Proteins durch Zerfall (saure Hydrolyse) oder während der Aufarbeitung verloren ging. Die nach Bromcyanspaltung zurückbleibende Proteinbande wurde durch Präzipitation mit Anti-Protease-Serum als Exoprotease identifiziert. Hierzu wurde eine Bromcyanspaltung wie oben (ohne Mercaptoäthanol) durchgeführt und nach Trennung der Proben in einer SDS-PAGE der Gelausschnitt im Proteasebereich (bestimmt durch Anfärbung einer Kontrollprobe) auf ein Agarosegel gelegt, so daß das Protein gegen das in Depots eingefüllte Antiserum diffundieren konnte (Ouchterlony-Diffusionstest). Nach einigen Tagen war

deutlich eine Präzipitationslinie zu erkennen, so daß die Gelbande Exoprotease enthalten haben mußte (Abb. 25B). Auch für die Exoprotease aus S. marcescens DSM 30122, die immunologisch und in den getesteten Eigenschaften mit der Exoprotease aus S. marcescens ATCC 25419 identisch ist, konnte C. Brazel das gleiche Spaltproduktmuster durch Bromcyan nachweisen (18). Diese Daten werden außerdem von Decedue, der in der Exoprotease aus S. marc. ATCC 25419 einen Methioninrest feststellte, bestätigt (33).

3.7.3.2 ^{35}S-Cystein-Markierung

Der Cysteingehalt der Exoprotease wurde durch ^{35}S-Cystein-Markierung der Cystein-auxotrophen Mutante überprüft (wie in 2.16.2.4 angegeben). Weder nach 1 Std. Markierung mit 1 µCi ^{35}S-Cystein/ml noch nach Erhöhung der ^{35}S-Cystein-Konzentration auf 5 µCi/ml (1 - 15 Min. Puls) konnte nach Äthanolfällung oder Immunpräzipitierung des Zellüberstandes eine geschwärzte Proteasebande nach Autoradiographie des SDS-Geles (bis zu 3 Wo.) identifiziert werden. Da der ^{35}S-Cystein-Einbau in TCA-fällbares Material mit 39 % der eingesetzten Menge relativ hoch war und genügend Protease synthetisiert worden war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Exoprotease kein Cystein enthält. Dies stimmt mit den Daten der für die gleiche Exoprotease durchgeführten Aminosäurebestimmungen verschiedener Autoren überein (18, 33, 78, 92).

3.8 Versuche zur Identifizierung von Protein III

Nach der ^{35}S-Methioninmarkierung der Cystein-auxotrophen Mutante, S. marcescens EN 6, in Cys- und Met-freiem GBM wurden nach Immunfällung des Zellüberstandes zwei deutlich markierte Proteinbanden in der SDS-PAGE entdeckt (s. Abb. 23). Nach der Bromcyanspaltung enthält die Exoprotease zumindest einen Methioninrest, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß es sich bei beiden Banden um Proteaseformen handelt. (Die beabsichtigte spezifische Markierung einer Proform mit ^{35}S-Methionin war somit nicht möglich). Die untere der beiden Proteinbanden konnte anhand der Größe (51.000 Dalton) und anhand von im Gel mitaufgetragenen Proteasemarkern als Exoprotease, d.h. Protease I identifiziert werden. Die obere Bande,

die einem um 2.000 - 2.500 Dalton höhermolekularen Protein zuzuordnen war, entsprach der Größe bzw. dem Laufverhalten in der SDS-PAGE nach der Protease III und wird deshalb im folgenden Protein III genannt. Gegen die Möglichkeit, daß die Protease III vorlag, sprach, daß diese zumindest in TY-Medium aufgrund ihrer geringen Konzentration fast nie entdeckt wurde und wenn, dann nur bei alkalischem pH größer 8 (der pH unter Cysteinmangelbedingungen liegt im Durchschnitt bei pH 7,8) und nur in Anwesenheit der Protease II, aus der sie hervorgeht. Da die Inkubationsbedingungen der Cysteinmangelmutante als dereguliert zu betrachten sind (Fehlen des essentiellen Cystein und Methionin, kein Wachstum), war somit das Vorliegen einer Proteasevorstufe im Zellüberstand nicht auszuschließen. Die Entstehung des Proteins III im Zellüberstand schien, zumal solches auch für Protease II und III im TY-Überstand ab der späten stationären Phase und besonders in der Absterbephase nachgewiesen war (s. 3.4), allerdings wahrscheinlicher zu sein. Auch lag ein erhöhter ^{35}S-Methionin-Einbau in das höhermolekulare Protein als Hinweis auf den Proformcharakter (wenn noch Formyl-Methionin-haltig), wie oben schon angegeben, nicht vor.

3.8.1 Partielle Proteolyse

Um neben der Immunfällbarkeit einen Hinweis zu erhalten, daß das Protein III eine Proteaseform darstellt und um einen Vergleich zum Spaltungsmuster von Protease I und II zu erhalten, wurde ein proteolytischer Verdau von Protein III im Gel durchgeführt. Hierzu wurde die Cysteinmangelmutante eine Stunde unter Cysteinmangelbedingungen, 1 Std. mit ^{14}C-Aminosäuren markiert (mit ^{14}C, um alle Spaltprodukte nach Autoradiographie zu erfassen) und der Zellüberstand nach Immunpräzipitation einer SDS-PAGE unterzogen. Die Protease I und das Protein III wurden nach Trocknen des Gels herausgeschnitten und während einer zweiten Gelelektrophorese verdaut. Aus der danach durchgeführten Autoradiographie in Abb. 26 ist zu erkennen, daß beide Proteine identische Spaltproduktmuster aufweisen, die dem der Protease I entsprechen (s. Abb. 3). Die bei der Protease II (Abb. 3) in der SDS-PAGE langsamer laufenden Spaltprodukte, die den Proteinen mit 18.000 Dalton und 10.000 Dalton entsprechen, sind bei Protein III nicht zu beobachten.

Durch die partielle Proteolyse im Gel konnte die Verwandtschaft der Protease I und des Protein III bestätigt werden. Hierbei schien es sich aber nicht um die im Überstand entstehende Protease III zu handeln, da sonst die Wiederspiegelung des (wenn auch nur scheinbaren) Größenunterschiedes der beiden Proteine in den Spaltprodukten zu erwarten gewesen wäre, da dies bei der Protease II-Spaltung festgestellt wurde (s. Abb. 3). Wäre das Protein III eine Proteasevorstufe gewesen, dann hätte keines der wiedergefundenen Spaltprodukte das Zusatzpeptid getragen, was allerdings bei der geringen Zahl der Spaltprodukte (nur 4) nicht unbedingt gegen den Proformcharakter gesprochen hätte. In vergleichbaren proteolytischen Spaltungen von als Proformen identifizierter Proteine wurden allerdings immer ein oder mehrere Signalpeptid-haltige Spaltprodukte erhalten (42, 122).

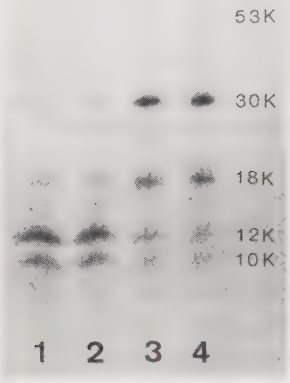

Abb. 26: Partielle Proteolyse von Protease I und Protein III (Autoradiographie 8 Wo.). S. marc. EN 6 wurde nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen 1 Std. mit ^{14}C-Aminosäuren (15 µCi/ml) markiert. 0,3 ml Zellüberstand wurde nach 2.11.3.2 immungefällt und eine SDS-PAGE angeschlossen. Die Protease I- und Protein III-Bande wurde aus dem getrockneten Gel anhand der nach Autoradiographie auftretenden Bandenmuster herausgeschnitten und in einem 2. Gel während der Elektrophorese mit V8-Protease gespalten. Proteine: Protease I (1, 3), Protein III (2, 4), V8-Proteasekonzentration: 100 ng (1, 2), 5 ng (3, 4).

3.8.2 Versuche mit der Cysteinmangelmutante

3.8.2.1 Pulsmarkierung unter Cysteinmangelbedingungen

Um zu testen, ob das Protein III, das wahrscheinlich, was aus indirekten Daten[1] hervorging, eine aktive Protease war, aus der Protease I im Zellüberstand im Laufe der Zeit entsteht (wie die Proteaseformen im TY-Medium) oder ob es eine Proteaseproform war, die als erstes Protein in das Medium

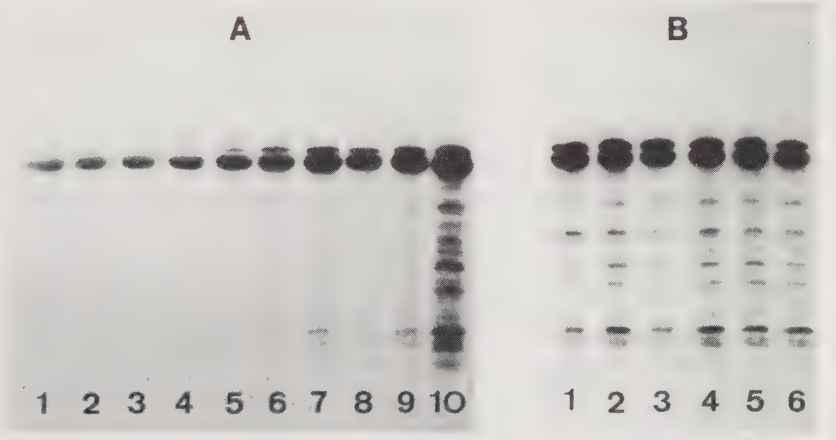

Abb. 27: ^{35}S-Methionin-Markierung der Cysteinmangelmutante.
A: Pulsmarkierung. Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen mit ^{35}S-Methionin (1 µCi/ml) markiert und nach verschiedenen Pulsintervallen (s. u.) Aliquots der Kultur in ein Eis/NaCl-Bad transferriert. Nach Gewinnung des Zellüberstandes durch Zentrifugation wurde eine Immunfällung (nach 2.11.3.1) mit anschließender SDS-PAGE durchgeführt. Immunpräzipitat von je 1 ml des Zellüberstandes nach: 15 Sek. (1), 30 Sek. (2), 1 Min. (3), 2 Min. (4), 3 Min. (5), 5 Min. (6), 10 Min. (7), 15 Min. (8), 30 Min. (9), 60 Min. (10).
B: "Pulse-chase"-Versuch. Zellen wurden wie in A beschrieben 10 Min. mit ^{35}S-Methionin (1 µCi/ml) pulsmarkiert und der "chase" durch Zugabe von unmarkiertem Methionin und Chloramphenicol eingeleitet. Die Zellüberstände (1 ml) wurden nach 0 Min. (1), 1 Min. (2), 5 Min. (3), 15 Min. (4), 30 Min. (5) und 60 Min. "chase" durch Zentrifugation gewonnen und nach Immunfällung (nach 2.11.3.1) in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

1: Markierter Zellüberstand (mit Protease I und Protein III) wurde über eine DEAE-Cellulose-Säule (Pasteurpipette) getrennt. Die aktive Fraktion enthielt Protein III. Da die Protease I nicht im Gel wiedergefunden wurde, konnte dies nicht als direkter Beweis der Aktivität von Protein III gewertet werden.

gelangt und dort eventuell in die Protease I übergeht, wurde eine Pulsmarkierung durchgeführt. Zellen von S. marcescens EN 6 wurden unter Cysteinmangelbedingungen bis zu 1 Std. mit ^{35}S-Methionin markiert und die Zellüberstände auf Antigengehalt mit Hilfe der Immunfällung und anschließender SDS-PAGE untersucht. Im Autoradiogramm (Abb. 27A) sieht man, daß zu jedem Zeitpunkt beide Proteine im Zellüberstand vorliegen, ihre Konzentrationen bis zu einer Stunde stark ansteigen, ihr Verhältnis zueinander aber gleich bleibt. Es ist kein Übergang der Proteine ineinander (in keiner Richtung) festzustellen.

3.8.2.2 "Pulse-chase"-Versuch unter Cysteinmangelbedingungen

Da in Markierungsexperimenten trotz gleicher Bedingungen das Bandenverhältnis von Protease I und Protein III unterschiedlich war und bei der vorangegangenen Pulsmarkierung (3.8.2.1) eine Umwandlung der Proteine ineinander durch Neusynthese eventuell unentdeckt geblieben war, wurde die Beziehung der beiden Proteine zueinander mit einem "Pulse-chase"-Versuch überprüft. Zellen von S. marcescens EN 6 wurden nach 3 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen 10 Min. lang mit ^{35}S-Methionin markiert und der "chase" durch Zugabe von Chloramphenicol und unmarkiertem Methionin eingeleitet. Nach verschiedenen "chase"-Intervallen (1 - 60 Min.) wurden die Zellüberstände durch Zentrifugation gewonnen, immungefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Aus Abb. 27B geht hervor, daß innerhalb des getesteten Zeitraums das Verhältnis beider Proteinbanden zueinander gleich blieb. Ein Übergang ("processing") von Protein III in Protease I oder eine Umwandlung der Protease I in Protein III war nicht festzustellen.

3.8.3 Versuche mit dem Wildtyp

Die vorausgegangenen Untersuchungen des Protein III waren unter der Annahme durchgeführt worden, daß das Protein III aufgrund der anormalen Züchtungsbedingungen von S. marcescens EN 6 unter Cystein- und Methioninmangel in das Medium gelangt. In TY-Medium war, wie oben berichtet, die Protease III, die in gleicher Position wie das Protein III in der SDS-PAGE läuft, nur in der späten Absterbephase, nur in minimaler Menge und immer nur in Anwesenheit von Protease II gefunden worden. Eine Kom-

bination von Protease I und III war in keinem Zellstadium nachweisbar (s.Abb. 1 und 2). Im folgenden werden Experimente beschrieben, in denen Wildtypzellen (S. marcescens ATCC 25419) unter normalen Zuchtbedingungen, also in TY-Medium, mit Hilfe von radioaktiver Markierung auf Protein III-Gehalt (bzw. Proform-Gehalt) im Zellüberstand und Zellextrakten untersucht wurden.

3.8.3.1 Markierung in TY-Medium

Es wurde schon oben erwähnt, daß bei kurzer Pulsmarkierung (5 Sek.) der in TY-Medium gezüchteten S. marcescens ATCC 25419-Kultur nur die Protease I im Zellüberstand nach Immunpräzipitation in der SDS-PAGE (im Autoradiogramm) auftauchte (s. Abb. 22). Wird die ^{14}C-Markierung der Wildtypzellen in TY-Medium 30 Min. lang durchgeführt und das mit dem Zellüberstand gewonnene Immunpräzipitat in einer SDS-PAGE aufgetrennt, dann tauchen auch hier unter den normalen Zuchtbedingungen im Autoradiogramm zwei Proteinbanden auf. Diese entsprechen denen, die unter den Cysteinmangelbedingungen von S. marcescens EN 6 gebildet werden, wie die, zur Kontrolle durchgeführte Immunfällung von Überstand, der ebenfalls 30 Min. mit ^{14}C-Aminosäuren markierten Cysteinmangelmutante nach 2,5 Std. Inkubation im AS-GBM ohne Cys + Met zeigte (Abb. 28). Somit scheint das Protein III eine Proteaseform zu sein, die unter normalen Zuchtbedingungen in so geringer Konzentration auftritt, daß sie nur durch radioaktive Markierung nachweisbar wird. Um zu testen, ob die markierte Protease I aus dem Cysteinmangelmutantenüberstand in Protease II oder III übergeht, wurde der Zellüberstand in Anwesenheit von Orthophenanthrolin 30 Min. gekocht. Da die Protease I-Bande zugunsten der Protein III-Bande abnahm (Spalte 2) könnte das Protein III doch der Protease III entsprechen. Das zeitliche Erscheinen der höhermolekularen Proteaseform und ihr Verhalten im Zellüberstand des Wildtyps, gezüchtet in TY-Medium, wurde untersucht.

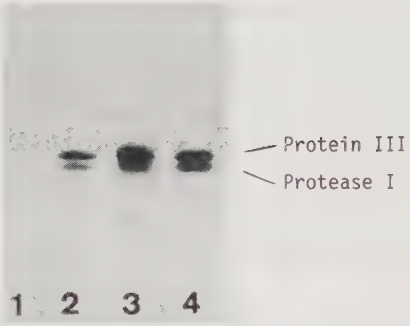

Abb. 28: Immunfällung von TY-Überstand und AS-GBM ohne Cys + Met-Überstand nach ^{14}C-Aminosäure-markierung (Autoradiographie 5 T.). Spätlogarithmische,in TY-Medium gezüchtete Zellen,von S. marc. ATCC 25419 und S. marc. W 831 (Prot.$^-$) und Zellen von S. marc. EN 6, nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen, wurden 30 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (5 µCi/5 x 10^8 Zellen) markiert. Nach Stop des Pulses durch Eis und unmarkierte Aminosäuren wurde der Zellüberstand (von 5 x 10^8 Zellen) durch Zentrifugation gewonnen und nach Immunfällung (2.11.3.2) in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zellüberstand (von 5 x 10^8 Zellen) der Cysteinmangelmutante wurde außerdem vor der Immunfällung 30 Min. in Anwesenheit von 10 mM OPA gekocht. Immungefällter Zellüberstand: Proteasemangelmutante (1), Wildtyp (2), Cysteinmangelmutante gekocht (3), Cysteinmangelmutante (4).

3.8.3.2 "Pulse-chase"-Versuche in TY-Medium

In einem "Pulse-chase"-Versuch wurden Wildtypzellen bis in die Sekretionsphase in TY-Medium gezüchtet, 3 Min., 10 Min. und 60 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren pulsmarkiert und ein jeweils 60 Min. langer "chase" in Anwesenheit von Chloramphenicol und unmarkierten Aminosäuren angeschlossen. Die Zellen wurden sedimentiert, durch Kochen in SDS aufgeschlossen und wie die dazugehörigen Zellüberstände einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Autoradiographie durchgeführt. In Abb. 29 ist zu sehen, daß aus den Zellextrakten kein Protein mit Anti-Protease-Serum ausfällbar war. Dies stimmt mit den oben beschriebenen Versuchen überein,in denen ebenfalls unter normalen Wachstumsbedingungen kein Antigen intrazellulär nachweisbar war (s. 3.6). Die Immunfällungen der Zellüberstände lieferten in allen Puls- und "pulse-chase"-Proben zwei Proteinbanden (Abb. 29).

Abb. 29: "Pulse-chase"-Versuch mit S. marc. ATCC 25419 in TY-Medium (Autoradiogramm 8 T.). Eine spätlogarithmische TY-Kultur wurde 3 Min., 10 Min. und 60 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (5 µCi/7,6 x 10^8 Zellen) markiert und der "chase" durch Zugabe von Chloramphenicol und unmarkierten Aminosäuren eingeleitet. Nach 0 Min. (= Puls) und 60 Min. wurde der "chase" durch Eis gestoppt, die Zellen (7,6 x 10^8) nach Sedimentation durch Kochen in SDS aufgeschlossen und mit den Zellextrakten und dazugehörenden Zellüberständen eine Immunfällung (2.11.3.2) mit anschließender SDS-PAGE durchgeführt. Zellextrakte: Pulsmarkierung 3 Min. (1), 10 Min. (5), 60 Min. (9), "chase" 3 Min. (2), 10 Min. (6), 60 Min. (10). Zellüberstände: Pulsmarkierung 3 Min. (3), 10 Min. 67), 60 Min. (11), "chase" 3 Min. (4), 10 Min. (8), 60 Min. (12). Der Pfeil zeigt die Position der Protease I an (bestimmt anhand eines Proteasemarkers) (auch bei Exponierzeiten bis zu 7 Wochen war kein zellgebundenes Antigen zu erkennen).

Schon aus der Pulsmarkierung (Spalte 3, 7, 11) kann geschlossen werden, daß Protein III aus der Protease I über eine Zwischenform im Zellüberstand entsteht. Diese Entstehung ist innerhalb einer Stunde abgeschlossen. Die Bandendifferenzen und Intensitäten bleiben nach 60 Min. Puls und "chase" identisch (Spalte 11 + 12). Der 60 Min. "chase" nach 3 Min. Pulsmarkierung (Spalte 4) zeigt (trotz Materialverlust), daß die Protease I-Bande zugunsten der höhermolekularen Bande abnimmt, wobei der Größenunterschied nicht so deutlich wie bei den anderen beiden Proben ist. Am besten ist der Übergang der Protease I in Protein III, über die im Puls noch zu erkennende Zwischenform, nach 10 Min. Markierung zu sehen

(Spalte 7 + 8). Die im Puls noch dominante Protease I-Bande (Verh. 2:1) nimmt in der "chase"-Probe zugunsten der Protein III-Bande ab (Verh. 1:1). Die Zwischenform ist nach dem "chase" nicht mehr vorhanden. Insgesamt konnte festgestellt werden, daß die Protease I als erstes Protein in das Medium ausgeschieden wird (5 Sek. Pulsmarkierung, s. Abb. 22) und dort wahrscheinlich über eine Zwischenstufe in das Protein III übergeht (Abb. 29). Somit kann das Protein III, wie auch vermutet, keine Proform sein, sondern ist, wie indirekt bestätigt, eine aktive Protease und entspricht wahrscheinlich der Protease III. Da alle bisher gefundenen höhermolekular erscheinenden Proteine offensichtlich im Zellüberstand entstehen und somit kein direkter Zusammenhang mit dem Proteasesekretionsmechanismus zu erwarten war, wurden keine weiteren Untersuchungen zur Identifizierung der nun auch während der Sekretionsphase im TY-Medium (nach radioaktiver Markierung) nachgewiesenen beiden höhermolekularen Proteaseformen unternommen, sondern nach weiteren Möglichkeiten gesucht, eine echte Proteasevorstufe in der Zelle anzuhäufen.

3.9 Versuch der Anreicherung eines Proteasevorläuferproteins bei 18°C und 42°C

Da der Nachweis einer Proteasevorstufe mit der Cystein-auxotrophen Mutante nicht gelungen war, wurden weitere Möglichkeiten einer Proformanreicherung untersucht. Einige Autoren konnten zeigen, daß die Temperatur die Proteasesekretion beeinflußt (5, 42, 129), wobei auch die Anhäufung einer Proform bei erniedrigter Inkubationstemperatur festgestellt wurde (26). Es wurde getestet, ob die Wachstumstemperatur eine Rolle bei der Exoproteasesekretion spielt. Hierzu wurden Zellen von S. marcescens ATCC 25419 in TY-Medium bei 30°C bis in die späte logarithmische Phase gezüchtet und dann bei 18°C und 42°C weiterinkubiert. In Abb. 30A ist zu sehen, daß das Wachstum bei 18°C nach einer 2stündigen verminderten Rate dem bei 30°C vergleichbar war und die maximale Zelldichtezunahme die der Kontrollkultur noch übertraf (um 11,5 % nach 21 Std.). Die Pro-

teaseaktivität im Zellüberstand stieg mit Zunahme der Zelldichte an, wobei aber pro Zelle weniger Protease ausgeschieden wurde als bei 30°C (Abb. 30A und B). Die Proteasefreisetzung pro Zellzahl erfolgte bei 18°C über einen längeren Zeitraum (2 - 5 Std.) mit vergleichbarer Rate, die um ca. 75 % geringer war als die maximal erreichte Sekretionsrate

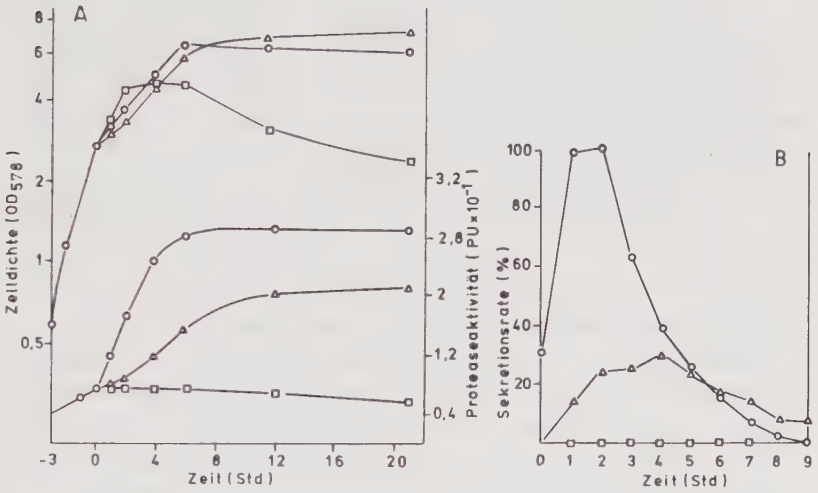

Abb. 30: Einfluß der Temperatur auf die Proteasesekretion. Zellen von S. marc. ATCC 25419 wurden bei 30°C bis in die späte logarithmische Phase in TY-Medium gezüchtet und dann Aliquots der Kultur bei 18°C und 42°C weiter inkubiert (ab "0 Std."). Das Zellwachstum (A, oben) und die Proteaseaktivität (A, unten) wurde verfolgt. Um die Proteasesekretion pro Zellzahl zu bestimmen, wurden die Sekretionsraten (Δ PU/Std./OD_{578}) aus den in A erhaltenen Werten abgeleitet (B). Temperatur: 30°C (O), 18°C (Δ), 42°C (□).

der Kontrollkultur (nach 2 Std.). Der Temperaturshift auf 42°C hatte ein abweichendes Wachstums- und Sekretionsverhalten zur Folge. Das Wachstum wurde durch die Temperaturerhöhung stimuliert, erreichte aber schon nach 2 Std. den Maximalwert, der zu diesem Zeitpunkt um 65 % über dem des Kon-

trollwertes (Zunahme) lag. Nach einer kurzen stationären Phase nahm die Zelldichte bis zu 21 Std. auf mehr als die Ausgangszelldichte ab. Der Zellzyklus ist demnach bei 42°C stark verkürzt. Der Gesamtzellzuwachs betrug nur 54,1 % des bei 30°C erreichten. Trotz des anfänglich erhöhten Wachstums war kein Anstieg der Proteaseaktivität festzustellen. Da die Proteaseautolyse innerhalb 2 Std. im Zellüberstand bei 40°C bis zu 30 % betragen kann (125), war nicht auszuschließen, daß dennoch Protease, dann aber mit verminderter Rate, ausgeschieden worden war.

Die Änderung der Wachstumstemperatur hat sowohl bei Erniedrigung als auch bei Erhöhung einen Einfluß auf die Exoproteasesekretion. Die Anhäufung einer Proform in der Zelle konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation bei 30°C unter Cysteinmangelbedingungen 1 Std. lang mit ^{35}S-Methionin (22 µCi/ml) während des Temperatur-Shifts auf 18°C bzw. 42°C markiert und der Zellüberstand und die Zellextrakte auf Antigengehalt überprüft (s. 2.10.2.3). Es konnte keine zellgebundene Proteaseform nachgewiesen werden. Im Zellüberstand war jedoch Protease I und Protein III, aber in geringerer Konzentration als bei der Kontrollkultur (30°C), festzustellen. Bei 10 Min. Vorinkubation auf 42°C vor der einstündigen Markierung (obige Bedingungen, aber mit 22 µCi/ml ^{14}C-Aminosäuregemisch) wurde auch aus dem Zellüberstand keine Proteaseform bei der 42°C-Probe mit Anti-Exoprotease-Serum ausgefällt. Hieraus wurde geschlossen, daß die Temperatur offensichtlich einen Einfluß auf die Proteasesynthese nicht aber auf die Sekretion hat. Bei 18°C ist die Synthese vermindert, eine Anhäufung einer zellgebundenen Vorstufe erfolgt nicht. Bei 42°C erfolgt keine oder nicht nachweisbare Proteasesynthese, da nach Vorinkubation kein markiertes Protein weder innerhalb noch außerhalb der Zelle gefunden wurde. Auch konnte im Ouchterlony-Diffusionstest kein zellgebundenes Antigen (nach Frenchpress-Aufschluß) nachgewiesen werden und kein Anstieg der intrazellulären Aktivität, weder nach Frenchpress-Aufschluß (Zellen mit höchster Zelldichte) noch nach Ultraschallaufschluß (1 Std. Shift) bei 18°C oder 42°C festgestellt werden (s. Tab. 6).

3.10 Versuche zur Anreicherung einer Proteasevorstufe durch Einsatz von "Sekretionsinhibitoren"

Wie schon oben erwähnt, sind inzwischen verschiedene Hemmstoffe bekannt, die die Entkoppelung der gut koordinierten Synthese- und Sekretionsschritte verschiedener sekretorischer Proteine bewirkten, so daß deren Vorstufen akkumulierten und somit nachweisbar wurden. Da diese hier genannten "Sekretionsinhibitoren" oder "Proformanreicherungssubstanzen" keine generelle Wirkung zeigen, sollte durch den Einsatz mehrerer unterschiedlicher Hemmstoffe die Wahrscheinlichkeit ein wirksames Mittel zur "spezifischen" Anreicherung eines Proteasevorläufers zu finden, erhöht werden. Außerdem war damit die Möglichkeit, verschiedene Schritte während der Synthese bzw. Sekretion zu blockieren, größer, so daß eventtuell verschiedene Zwischenstufen und/oder unterschiedliche Lokalisationen einer oder mehrerer Proteaseformen nachweisbar wurden.

3.10.1 Wachstum und Proteasesekretion

Die Wirkung der einzelnen "Sekretionsinhibitoren" auf das Zellwachstum und die Exoproteasesekretion (gemessen über die Proteaseaktivität im Zellüberstand) wurde unter normalen Induktionsbedingungen im TY-Medium durchgeführt. Danach wurde jeweils die Substanzkonzentration für die sich anschließenden Markierungsexperimente (zum Nachweis einer zellgebundenen Vorstufe) ausgewählt, bei der eine möglichst geringe Beeinträchtigung des Zellwachstums bei gleichzeitiger möglichst starker Hemmung der Proteasesekretion erfolgt war.

3.10.1.1 Einfluß von Procain und Phenäthylalkohol

Procain und Phenäthylalkohol (PEA), die beide zur Klasse der lokalen Anästhetika zählen, wurden als "Proformanreicherungssubstanzen" für verschiedene sekretorische Proteine beschrieben (23, 27, 42, 48, 75, 98, 111, 113, 129). Ihre Wirkung, meist die Inhibition der Signalpeptidabspaltung, wird auf die Interaktion mit der Zellmembran zurückgeführt. Procain wurde außerdem als kompetitiver Trypsininhibitor beschrieben (42).

1) Procain

Die Wachstums- und Proteaseaktivitätskurven nach Zugabe verschiedener Procainkonzentrationen zu in TY-Medium gezüchteten Zellen sind in Abb. 31 wiedergegeben. Man sieht, daß mit der Zunahme der Procainkonzentration (ab 1 mM) der Zelldichte- und Proteaseaktivitäts-Zuwachs (im Zellüberstand) abnimmt. 1 mM Procain beeinträchtigt das Zellwachstum (ca. um 20 % vermindert) und die Proteasesekretion nur geringfügig. Nach 2 Std. leicht verminderter Rate wird nach 3 Std. genauso viel Protease pro Zelle ausgeschieden wie bei der Kontrolle (Abb. 31B). Nach 2 Std. Einwirkung von 10 mM Procain ist eine erhöhte Sekretions- oder Synthesehemmung festzustellen; die Sekretionsrate nimmt, nach anfänglicher gleicher Rate wie nach 1 mM Procainzugabe, ab. Zugabe von 20 mM Procain hat einen einstündigen Sekretionsstop zur Folge. Danach ist allerdings ein leichter Proteaseaktivitätsanstieg im Zellüberstand festzustellen, wobei die maximale Sekretionsrate (nach 2 Std.) um 90 % geringer ist als die der Kontrolle. 100 mM Procain bewirkt, trotz Wachstum, sofortigen anhaltenden Sekretionsstop. Procain zeigt somit zwei Effekte: Erstens, die Hemmung des Wachstums, die eine verminderte Proteaseausscheidung zur Folge hat (zu sehen bei 1 mM Procain). Zweitens, eine spezifische Synthese- oder Sekretionsinhibition, da ab Zugabe von 10 mM Procain die Proteaseausscheidung pro Zelle stark vermindert bzw. total inhibiert ist (bei 100 mM Procain).
Es wurde auch die Procainwirkung auf die 2 Std. unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) inkubierte Cystein-auxotrophe Mutante getestet. Die einstündige Inkubation mit verschiedenen Procainkonzentrationen ergab, daß bis zu 100 mM Procain keine Zellyse verursacht wurde (kein Wachstum unter diesen Inkubationsbedingungen) und mit der Zunahme der Konzentration eine mit den obigen Werten vergleichbare Sekretionsabnahme erfolgte. Damit sind die im Vollmedium erhaltenen Daten auf das AS-GBM ohne Cys + Met übertragbar.

2) Phenäthylalkohol (PEA)

Der Test des Einflusses von Phenäthylalkohol auf die Proteasesekretion bei S. marcescens ATCC 25419 wurde, wie oben für Procain beschrieben, durchgeführt. Alle PEA-Konzentrationen zeigten eine Wirkung auf das Zellwachstum, die drastischer als bei Procainzugabe war (Abb. 32A). Der Zelldichtezuwachs nahm mit Zunahme der PEA-Konzentration ab und erreich-

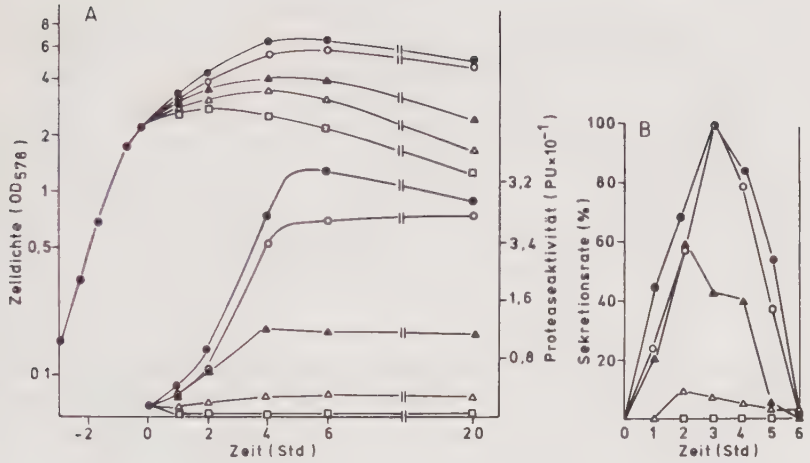

Abb. 31: Einfluß von Procain auf die Proteasesekretion. Zellen von S. marcescens ATCC 25419 wurden bei 30°C bis in die späte log-Phase in TY-Medium gezüchtet. Aliquots der Kultur wurden dann in Anwesenheit verschiedener Procainkonzentrationen (s.u.) weiter inkubiert (ab "0 Std.") und das Zellwachstum (A, oben) und die Proteaseaktivität im Zellüberstand (A, unten) verfolgt. Um die Proteasesekretion pro Zelle zu bestimmen, wurden die Sekretionsraten (△ PU/Std./OD_{578}) aus den in A erhaltenen Werten abgeleitet (B). Procainkonzentrationen: 0 mM und 0,1 mM (●), 1 mM (○), 10 mM (▲), 20 mM (△), 100 mM (□).

te bei 20 mM PEA im Ansatz nach 2 Std. nur noch ein Maximum, das um 70 % niedriger als die maximal erreichte Zelldichte der Kontrollkultr war. Bei dieser PEA-konzentration trat nach 2 Std. Zellyse auf. Sofortige Zellyse erfolgte nach Zugabe von 40 und 80 mM PEA. Auch die Proteaseaktivität im Zellüberstand war bei allen getesteten PEA-Konzentrationen beeinträchtigt. Wie nach Procainzugabe wurde pro Zellzahl weniger Protease ausgeschieden als bei der Kontrollkultur. Bei 20 mM PEA im Ansatz lag die maximale Sekretionsrate um 94 % unter der der Kontrollkultur (Abb. 32B). Ab 40 mM PEA erfolgte keine Proteasesekretion mehr (durch Zellyse wurde keine Aktivi-

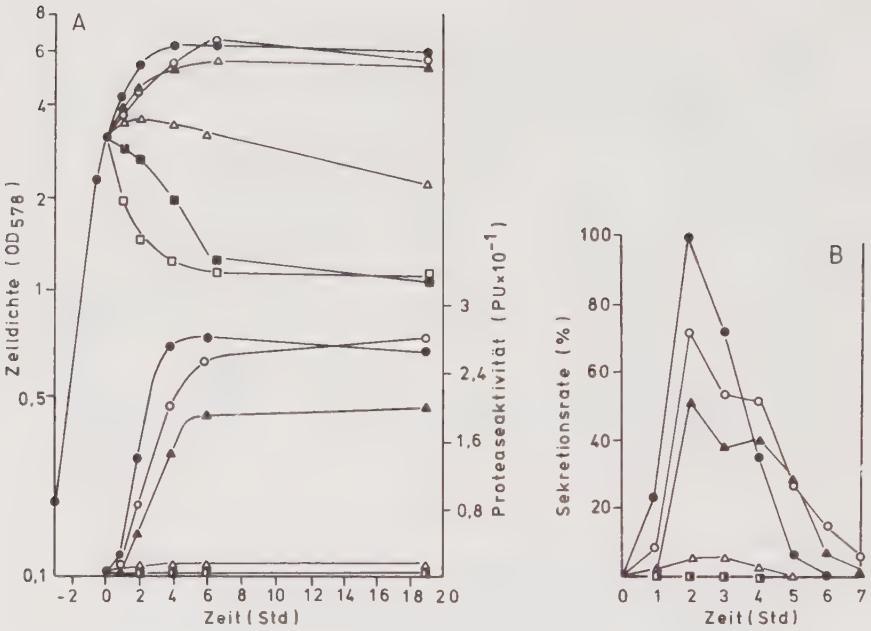

Abb. 32: Einfluß von Phenäthylalkohol auf die Proteasesekretion. Der Versuch wurde wie der mit Procain (s. Abb. 31) durchgeführt, außer daß Phenäthylalkohol in folgenden Konzentrationen eingesetzt wurde: 0 mM (●), 1 mM (o), 10 mM (▲), 20 mM (△), 40 mM (□) und 80 mM (□). Zelldichte (A, oben), Proteaseaktivität im Zellüberstand (A, unten), Sekretionsrate (△ PU/Std./OD_{578}) (B).

tät freigesetzt).

Der Grad der Proteasesynthese - oder Sekretionsinhibierung ist bei den verschiedenen Konzentrationen der Anästhetika annähernd gleich (PEA inhibiert jeweils etwas stärker), was die Annahme bestätigt, daß der Effekt von Procain und PEA auf das Zellwachstum nicht in direktem Zusammenhang mit dem auf die Proteaseausscheidung steht, so daß eine Proformanreicherung aufgrund der gemessenen Werte, besonders bei Einsatz von Konzentrationen um 20 mM, möglich schien.

3.10.1.2 Einfluß von TLCK und EDTA

Tosyl-Lysyl-chlormethylketon (TLCK), ein Trypsininhibitor, wurde auf seine Eigenschaft als Signalasehemmer (42) getestet. Hierdurch war auch die Wirkungsweise von Procain überprüfbar. Äthyldiamidtetraessigsäure (EDTA) wurde ebenfalls als Proteaseinhibitor (von Metalloenzymen) eingesetzt, wobei außerdem eine Verhinderung der Exoproteaseaktivierung (mit Zn^{2+}), als möglicher Sekretionsschritt, beabsichtigt war. Ein weiterer Effekt von EDTA, nämlich die Destabilisierung der äußeren Membran, sollte außerdem die Möglichkeit einer Proformanreicherung erhöhen.

1) TLCK

Die Wirkung von TLCK[1] auf die Proteaseausscheidung wurde wie oben mit den Wildtypzellen in TY-Medium getestet. TLCK-Konzentrationen bis zu 2,5 mM beeinträchtigten weder das Zellwachstum noch die Proteasesekretion (Abb. 33A). Zugabe von 5 mM TLCK hatte vermindertes Wachstum (nur noch maximal 60 % des maximalen Gesamtzelldichtezuwachses) und verminderten Proteaseaktivitätszuwachs im Überstand zur Folge. Innerhalb der ersten beiden Stunden betrug die Sekretionsrate nur ca. 7 % (bezogen auf die maximale Rate der Kontrolle) bzw. 11 % (bezogen auf die Rate nach 2 Std.), so daß bei dieser TLCK-Konzentration zumindest "kurzzeitig" eine starke Sekretionshemmung vorlag (Abb. 33B). Trotz verzögerter Sekretion wurde nach 6 Std. immerhin 86 % der Maximalrate der Kontrollkultur erreicht, was gegen eine mögliche Wirkung auf die Synthese spricht. Die Hemmstoff-Verdünnung durch Zellwachstum könnte hierbei eine Rolle spielen. Bei 10 mM TLCK im Ansatz erfolgte sofortige Zellyse, die allerdings nach 2 Std. aufhörte. Trotz erneutem Zellwachstum war zu keinem Zeitpunkt in Anwesenheit von 10 mM TLCK Proteaseaktivitätserhöhung festzustellen, so daß zumindest die Sekretionshemmung irreversibel war. Im Vergleich zu den getesteten Anästhetika ist der Wirkungsbereich von TLCK relativ eng und es genügt schon eine relativ geringe Konzentration (5 mM), um die Proteaseausscheidung zumindest 2 Std. lang stark zu inhibieren. Da schon bei 10 mM TLCK im Ansatz Zellyse erfolgte, wurde im weiteren mit 5 mM TLCK gearbeitet.

1: TLCK hemmt die Exoproteaseaktivität zumindest bis zu der getesteten Konzentration von 50 mM nicht.

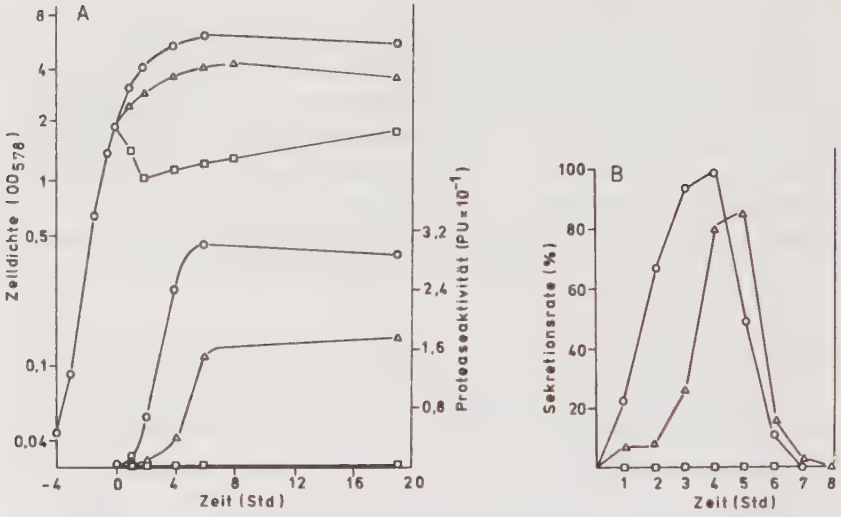

Abb. 33: Einfluß von TLCK auf die Proteasesekretion. Der Versuch wurde wie der mit Procain (s. Abb. 31) durchgeführt, außer daß TLCK in folgenden Konzentrationen eingesetzt wurde: 0 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM (o), 5 mM (△), 10 mM (□). Zelldichte (A, oben), Proteaseaktivität im Zellüberstand (A, unten), Sekretionsrate (△ PU/Std./OD_{578}) (B).

2) EDTA

EDTA-konzentrationen bis zu 10 mM zeigten fast keinen Effekt auf das Zellwachstum von in TY-Medium gezüchteten S. marcescens ATCC 25419-Zellen. Nach anfänglich geringfügig verminderter Wachstumsrate erreichten die Kulturen, die bis zu 1 mM EDTA enthielten, nach 6 Std. 100 %, die Kultur mit 10 mM EDTA noch 85 % des bei der Kontrolle erreichten maximalen Zelldichtezuwachses (Abb. 32A). Ab 0,1 mM EDTA im Ansatz war die Proteaseausscheidung, trotz gutem Wachstum, sehr stark betroffen. 0,1 mM EDTA bewirkte eine Verminderung der Sekretionsrate um mehr als 89 %, während ab 1 mM EDTA im Ansatz keine Proteasesekretion mehr erfolgte (Abb. 32A+B).

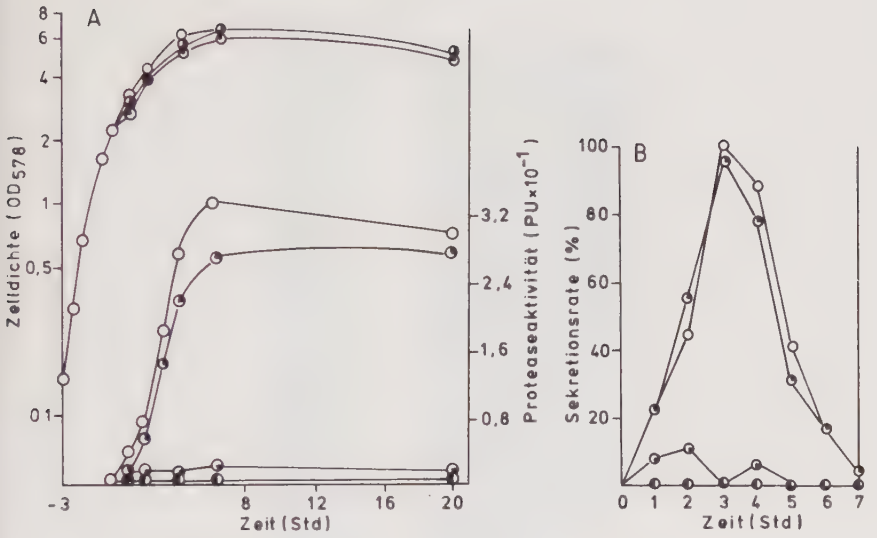

Abb. 34: Einfluß von EDTA auf die Proteasesekretion. Der Versuch wurde wie der mit Procain (s. Abb. 31) durchgeführt, außer daß EDTA in folgenden Konzentrationen eingesetzt wurde: 0 mM (○), 0,01 mM (◔), 0,1 mM (◑), 1 mM (◕), 10 mM (●). Zelldichte (A, oben), Proteaseaktivität im Zellüberstand (A, unten), Sekretionsrate (Δ PU/Std./OD_{578}) (B).

Der EDTA-Effekt wurde auch unter Cysteinmangelbedingungen getestet. Hierbei wurden die Zellen (S. marc. EN 6) nach dem Wechsel vom AS-GBM- in das Cys + Met-freie Medium in Anwesenheit von 0,01 - 10 mM EDTA bis zu 18 Std. weiterinkubiert. Die Zelldichte blieb unverändert (kein Wachstum, da Cys + Met-Mangel) und ab 1 mM EDTA im Ansatz wurde weniger als 2 % des bei der Kontrolle gemessenen Aktivitätszuwachses erreicht. In Anwesenheit von 0,1 % EDTA erfolgte allerdings eine stärkere Proteasesekretion (47 %) als im TY-Medium, was auf den höheren Gehalt zweiwertiger Ionen im Glycerolbasalmedium zurückgeführt wird.

Im Vergleich zu TLCK und den anderen bisher beschriebenen Substanzen und Bedingungen zeigt EDTA den drastischsten und spezifischsten Effekt auf die Exoproteasesekretion, bei gleichzeitig geringstem Einfluß auf das Wachstum. Da bei 0,1 mM EDTA im Ansatz die Proteaseaktivität bei pH 8 nicht gehemmt

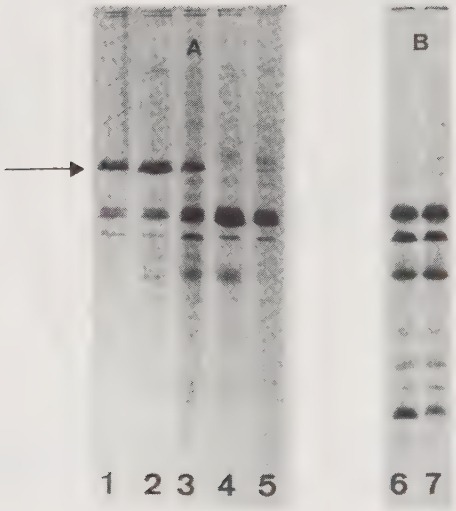

Abb. 35: A: Einfluß von EDTA auf die Proteasesekretion. Zellen von S. marc. E N 6 wurden in AS-GBM bis zum Ende der log-Phase gezüchtet, einmal in AS-freiem Medium gewaschen und in AS-GBM ohne Cys + Met in Anwesenheit verschiedener EDTA-Konzentrationen (s.u.) weiter inkubiert. Nach 4 Std. wurde jeweils 1,5 ml der EDTA-haltigen Zellüberstände und 0,75 ml des Kontrollüberstandes mit Äthanol gefällt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. EDTA-Konzentrationen: 0 mM (1), 0,01 mM (2), 0,1 mM (3), 1 mM (4), 10 mM (5). Der Pfeil zeigt die Position der Protease I an.
B: Einfluß von EDTA auf die Membranzusammensetzung. Zellen von S. marc. EN 6 wurden wie in A gezüchtet und nach 4 Std. Einwirkung von 1 mM EDTA die Membranfraktion nach EDTA/Lysozym-Aufschluß der Zellen (s. 2.6.3) gewonnen. Je 25 µg wurden nach Kochen in Elektrophoresemix in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die erhaltenen Bandenmuster waren mit denen nach 1 Std. EDTA-Einwirkung (obige Bedingungen) und mi denen von in TY-Medium gezüchteten Wildtypkulturen mit 1 mM EDTA (6 Std. wie in Abb. 32) oder ohne EDTA (jeweils Frenchpress-Aufschluß, s. 2.6.1) identisch. Kontrolle (6), 1 mM EDTA (7).

ist und bei 1 mM EDTA nur um ca. 15 %, kann die fehlende Aktivitätszunahme nicht auf Inaktivierung des Enzyms zurückgeführt werden, was durch Auftrennung von Zellüberstand in der SDS-PAGE (Abb. 35A) und die später gezeigten Markierungsversuche bestätigt wurde. Es fiel auf, daß in der SDS-PAGE eine niedermolekulare Bande (36.000 Dalton) mit Zunahme der EDTA-Konzentration im Zellüberstand verstärkt auftauchte (Abb. 35). Es wird vermutet, daß dieses Piliprotein (11) durch EDTA aus der äußeren Membran herausgelöst wird. Dies ist nicht verwunderlich, da dieses Protein auch, besonders bei Zucht der Zellen in GBM, nach langen Inkubationszeiten (20 Std.) gehäuft im Überstand vorliegt. Auch wurde es häufig als "Verunreinigung" in Immunpräzipitaten gefunden, da es zumindest z.T. in wässriger Lösung (Medium) ausfällt. Außer der Freisetzung dieses 36 K Proteins in das Medium war allerdings kein Einfluß von EDTA (1 mM) auf das Proteinmuster der Membranfraktion nach Zucht der Wildtypzellen in TY-Medium oder der Cysteinauxotrophen Zellen in AS-GBM ohne Cys + Met festzustellen (Abb. 35B).

3.10.1.3 Einfluß von Rifampicin

Die Proteinbiosynthese vieler sekretorischer Proteine ist Rifampicin-unempfindlich, was auf eine stabilere mRNA (55, 76, 145) oder seltener auf einen mRNA-Pool (105) zurückzuführen ist. S. marcescens ATCC 25419 wurde wie in den vorangegangenen Experimenten in TY-Medium mit verschiedenen Rifampicin-Konzentrationen (0,2 - 2.000 µg/ml) auf Wachstumshemmung untersucht. Ab 100 µg/ml Rifampicinzugabe wurde sofortiger Wachstumsstillstand festgestellt. Die Proteaseaktivität im Zellüberstand wurde in Anwesenheit von 200 µg/ml Rifampicin geprüft (Abb. 36A). Bis zu 1 Std. war Aktivitätszuwachs meßbar, der nach 30 Min. 50 %, nach 1 Std. noch 30 % des in der Kontrollkultur gemessenen erreichte. Pro Zellzahl wurde weniger Protease ausgeschieden als bei der Kontrollkultur (die Aktivitätskurven entsprachen im Verlauf denen in der Abb. 36A gezeigten), da nach 30 Min. 54 % der Aktivität/Zellzahl und nach 60 Min. nur 45 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurden. Die Proteasesekretion (wenn auch in verminderter Rate) über einen Zeitraum von 60 Min. ließ auf eine relativ stabile mRNA schließen. Um einen Anhaltspunkt für die Protease-mRNA-Halbwertszeit zu erhalten, wurde der Aktivitätszuwachs innerhalb 5 Min. für einige Zeiten nach Rifampicinzugabe bestimmt und der Prozentsatz zu den jeweiligen Werten der Kontrollkultur im logarithmischen Maßstab gegen die entsprechenden Zeitpunkte der Messung aufgetragen (Abb. 36B). Nach dieser Bestimmung

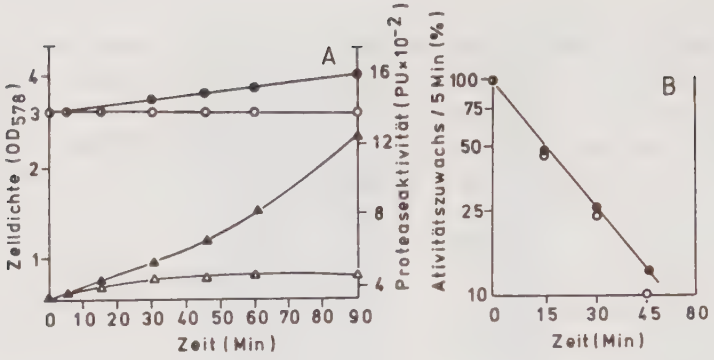

Abb. 36: Einfluß von Rifampicin auf die Proteasesekretion.
A: Zellen von S. marc. ATCC 25419 wurden in TY-Medium bis in die späte log-Phase gezüchtet. Zur Hälfte der Kultur wurde 200 µg/ml Rifampicin zugefügt und die Zellen bis zu 90 Min. weiter inkubiert. Das Wachstum (●) und die Proteaseaktivität im Zellüberstand (▲) der Kontrolle und der Rifampicin-haltigen Kultur (○/△) wurde verfolgt.
B: Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Protease-mRNA wurde die Zunahme der Proteaseaktivität innerhalb 5 Min. nach 5 Min., 15 Min., 30 Min. und 45 Min. Rifampicinzugabe (wie in A) bestimmt und der Prozentsatz zum jeweiligen Kontrollwert (ohne Rifampicin) berechnet. Proteaseaktivitätszunahme (PU/5 Min.) (○), (PU/5 Min./OD_{578}) (●).

sollte die mRNA der Exoprotease eine Halbwertszeit von 15 Min. haben, vorausgesetzt, das gesamte synthetisierte Material wurde ausgeschieden und lag aktiv vor.

Die Proteasesynthese- und sekretion, trotz Transcriptionshemmung, konnte in einem ^{14}C-Aminosäure-Markierungsversuch mit Wildtypzellen in TY-Medium bestätigt werden. Kulturaliquots wurden 5, 10 und 15 Min. mit 0,2 mg/ml Rifampicin vorinkubiert bevor der 5 Min.-Puls erfolgte. Die Zellüberstände und Zellextrakte wurden auf Antigengehalt (Immunfällung, SDS-PAGE) geprüft. In Abb. 37 ist zu sehen, daß bis zu 15 Min. Rifampicineinwirkung die Proteasesynthese nicht wesentlich (innerhalb 5 Min.) beeinträchtigte. Das gesamte synthetisierte Material wurde in das Medium ausgeschieden und lieferte zu jedem Zeitpunkt eine fast gleich starke Protease I-Bande wie die Kontrolle (ohne Rifampicin). Aus den Zellextrakten war bei keiner Probe Antigen ausgefällt worden.

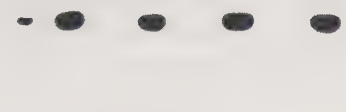

Abb. 37: Pulsmarkierung nach Rifampicineinwirkung (Autoradiogramm, 4 Wo.). Spätlogarithmische Zellen von S. marc. ATCC 25419 wurden 5, 10 und 15 Min. mit 200 µg/ml Rifampicin (Rif.) inkubiert und anschließend 5 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (5 µCi/9 x 10^8 Zellen bzw. 23 µCi/ml Kultur) markiert. Als Kontrolle wurde ein Aliquot der Kultur ohne Rifampicinzugabe 5 Min. wie oben markiert. Die Zellen (9 x 10^8) wurden durch Kochen in SDS (nach 2.6.2.b) aufgeschlossen und wie die dazugehörenden Zellüberstände immungefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zellextrakte: Kontrolle (1), 5 Min. Rif. (3), 10 Min. Rif. (5), 15 Min. Rif. (7), Zellüberstände: Kontrolle (2), 5 Min. Rif. (4), 10 Min. Rif. (6), 15 Min. Rif. (8), Protease I-Marker (9).

3.10.1.4 Einfluß von Natriumazid

Für einige sekretorische Proteine ist inzwischen eine Energie-abhängige Sekretion nachgewiesen worden (27, 29, 41, 113). Inhibitoren des Energiemetabolismus können somit zur Anreicherung von Proformen eingesetzt werden. Der Test von Natriumazid (NaN_3), einem Atmungsinhibitor, der den Elektronentransport und die oxidative ATP-Bildung unterbindet, auf Hemmung der Proteaseausscheidung erfolgte wie oben mit einer Serratia marcescens ATCC 25419-Kultur, die in TY-Medium bis zum Ende der logarithmischen Phase gezüchtet worden war. Bei allen getesteten NaN_3-Konzentrationen (3 - 30 mM) war ein starker Effekt auf das Zellwachstum innerhalb 140 Min. festzustellen (Abb. 38A). 3 mM NaN_3 im Ansatz verminderte den Zelldichtezuwachs um ca. 50 %, während ab 7,5 mM NaN_3 Zellyse erfolgte. Diese stagnierte um so früher je geringer die NaN_3-Konzentration war. Bei 7,5 mM und 18 mM NaN_3 im Ansatz wurde danach wieder geringes Zellwachstum festgestellt. Die Proteaseaktivität im Zellüberstand stieg in

Anwesenheit von bis zu 7,5 mM NaN_3 über den getesteten Zeitraum an, wobei der Anstieg innerhalb einer Stunde dem der Kontrolle entsprach. Auch bei 18 mM NaN_3-Zugabe wurde nach anfänglichem Aktivitätsrückgang ein leichter Anstieg (nach 15 Min.) gemessen. Nach Zugabe von 30 mM NaN_3 war weder erneutes Zellwachstum noch Proteaseaktivitätserhöhung im Überstand festzustellen. Bezieht man die Proteaseaktivität auf die Zelldichte, dann wird in Anwesenheit von 3 mM und 7,5 mM NaN_3 über eine Stunde lang mehr Protease ausgeschieden (125 %) als bei der Kontrollkultur (100 %) (Abb. 38B). Dies ist im Vergleich zu allen bisher getesteten Substanzen einmalig. Die gesteigerte Sekretion, selbst bei inhibiertem Wachstum (bei 7,5

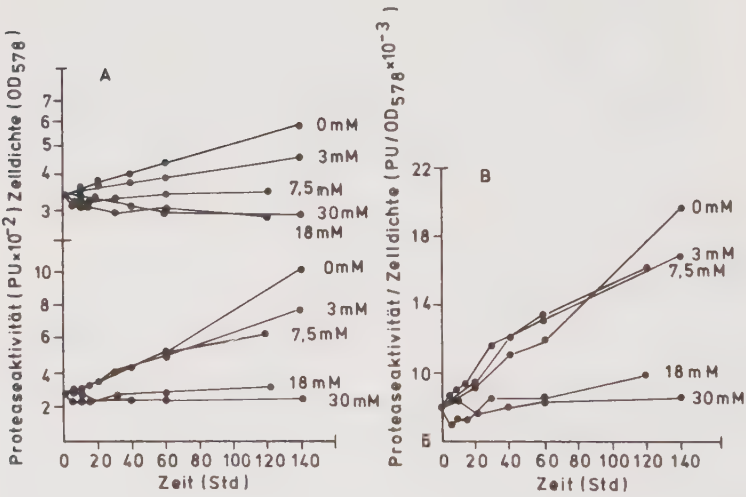

Abb. 38: Einfluß von Natriumazid auf die Proteasesekretion. Spätlogarithmische Zellen von S. marc. ATCC 25419 (im TY-Medium) wurden in Anwesenheit der in der Abb. angegebenen NaN_3-Konzentrationen 140 Min. bei 30°C gezüchtet. Das Zellwachstum und die Proteaseaktivität im Zellüberstand wurden verfolgt (A). In (B) ist die Proteaseaktivität pro Zelldichte angegeben (der Einfluß von 7,5 mM und 18 mM NaN_3 wurde in einem getrennten Versuch getestet. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven in das obige Diagramm miteingezeichnet).

NaN_3) kann nicht auf Zellyse zurückgeführt werden, da diese auch bei 3 mM NaN_3 (Wachstum) erfolgte und sonst auch bei 18 mM und 30 mM NaN_3 im Ansatz während der Lyse eine Aktivitätserhöhung festzustellen sein müßte. Die Daten lassen noch keinen eindeutigen Schluß über die Energieabhängigkeit der Proteasesekretion zu. NaN_3 scheint eher auf die Proteasesynthese als auf die Sekretion zu wirken, was aus den Daten mit 18 mM NaN_3 geschlossen werden kann, da hier, sobald die Zellen das Gift "verkraftet" haben, wieder Protease ausgeschieden wird. Da sogar bei 7,5 mN NaN_3-Zugabe trotz Stagnation des Wachstums noch genauso viel Protease wie bei der Kontrollkultur ausgeschieden wird (innerhalb 60 Min.), kann sogar eine Synthese und/oder Sekretionsstimulierung der Exoprotease durch NaN_3 angenommen werden. Im Gegensatz zu allen bisher getesteten "Proformanreicherungssubstanzen" beeinträchtigt NaN_3 in allen getesteten Konzentrationen stärker das Zellwachstum (Verminderung, Lyse) als die Proteasesekretion, die teilweise sogar erhöht wird.

3.10.2 Test der intrazellulären Aktivität nach Zugabe von "Proformanreicherungssubstanzen" und nach Temperatur-Shift auf 18°C bzw. 42°C

Die Akkumulation einer aktiven Proteasevorstufe nach Einwirkung der verschiedenen Hemmstoffe oder nach Temperatur-Shift sollte durch eine erhöhte intrazelluläre Proteaseaktivität feststellbar sein. Zellen von S. marc. ATCC 25419, die wie in den vorangegangenen Abbildungen (Abb. 30 - 36) in Anwesenheit verschiedener "Proformanreicherungssubstanzen" (bzw. nach T-Shift) gezüchtet worden waren, wurden im Stadium der maximal erreichten Zelldichte (ca. 4 - 6 Std. nach Hemmstoffzugabe) nach Frenchpress-Aufschluß (wie in 2.6.1 angegeben) auf intrazelluläre Aktivität getestet. Da nicht auszuschließen war, daß nach dieser Zeitspanne die intrazelluläre Aktivität abgebaut oder vermindert war, wurde außerdem von den obigen Kulturen jeweils nach 1 Std. Inkubation ein Zellaufschluß mit Ultraschall (wie in 2.6.4 beschrieben) durchgeführt (allerdings mit ca. 4 - 6mal weniger Zellen im Ansatz). In Tab. 6 sind die gemessenen Werte wiedergegeben. Zum Aktivitätsvergleich sind auch jeweils die extrazellulären Proteaseaktivitätszunahmen (Zellüberstand) nach Zugabe der "Proformanreicherungssubstanzen" und ebenfalls die intrazelluläre Aktivität nach "Frenchpress"-

Tab. 6: Test der intrazellulären Proteaseaktivität nach Zugabe von "Sekretionsinhibitoren" und bei 18°C und 42°C.

Probe	Proteaseaktivität (PU x 10^{-3})					
	extrazellulär		zellgebunden	intrazellulär		
	Überstand		Kultur	Frenchpress/mg		Ultraschall[2]
	(4-6 Std.)	(1 Std.)	(4-6 Std.)	(4-6 Std.)		(1 Std.)
Kontrollen	218	47	0	1,75	0,67	(0,13)
(30°C)	316	26	1,33	1,53	-	(0,15)
	274	32	0,15	1,03	0,4	-
18°C	85	8	0	1,6	0,64	0
			-	1,72	-	
42°C	0	0	0	0,33	0,46	0
			-	0,98	-	
Procain (20 mM)	16	0	-	0,68	0,32	(0,28)
PEA (20 mM)	12	6	-	1,1	-	0
TLCK (5 mM)	148	2	0	0	0	(0,08)
EDTA (1 mM)	0	0	1,0	1,95	0,7	0
Rifampicin[1] (200 µg/ml)	14	14	-	1,05	-	-
WT 30°C 80 Std.	-	-	-	40	41,5	-

1: Nach 1 Std. Inkubation gemessen

2: Die in Klammer angegebenen Werte sind ungenau, da sie im kritischen Bereich des Azocaseintestes gemessen wurden, auch sind sie nicht direkt vergleichbar mit denen nach Frenchpress-Aufschluß, da weniger Zellen eingesetzt wurden.

Aufschluß einer in der Absterbephase befindlichen Kultur (WT, TY-Medium) mit angegeben. Man sieht, daß die Kontrollkulturen ab der späten logarithmischen Phase (Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe) bis zur stationären Phase (maximale Zelldichte) ca. 200 - 300 PU (verschiedene Versuche) in das Medium freisetzt. Intrazellulär sind bei den Kontrollen nach "Frenchpress"-Aufschluß nur ca. 1 - 2 PU (bzw. 0,4 - 0,7 PU/mg) zu finden. Alle getesteten Kulturen, die in Anwesenheit der "Sekretionsinhibitoren" bzw. bei 18°C und 42°C gezüchtet wurden, zeigten keine erhöhte intrazelluläre Aktivität ("Frenchpress"-Aufschluß). Die gemessenen Werte sind im Vergleich

zu denen der extrazellulären Aktivität bzw. der intrazellulären Aktivität während der Absterbephase so gering, daß die Schwankungen vernachlässigbar sind. Die in der Gesamtkultur der Kontrollen (nach 3maligem Waschen) gemessene Aktivität, die weniger als 1 % der im Überstand gemessenen ausmacht, rührt mit großer Wahrscheinlichkeit von restlicher Überstandsaktivität her und ist wohl nicht als Oberflächen-gebundene Aktivität zu betrachten. Die in der EDTA-haltigen Kultur gefundene Aktivität kann nicht von restlicher Proteaseaktivität des Überstandes herrühren, da keine (bzw. nur ca. 4 PU vor EDTA-Gabe) vorlag. Hier könnte es sich somit um eine an der Zelloberfläche befindliche Proteaseaktivität handeln, die trotz dreimaligem Waschen der Zellen nicht losgelöst wurde. Die nach einer Stunde Inkubation mit den Hemmstoffen in den Ultraschall-Aufschlüssen gemessenen Aktivitäten lagen im kritischen Bereich des Azocaseintestes und sind nur untereinander, nicht aber mit denen nach "Frenchpress"-Aufschluß direkt vergleichbar. Auch hier konnte keine Aktivitätserhöhung festgestellt werden, obwohl eine Zunahme um ca. 25 - 50 PU, wie sie innerhalb einer Stunde im Zellüberstand meßbar ist, auch bei dieser Methode nachweisbar sein sollte. Insgesamt kann hieraus geschlossen werden, daß entweder keine Anreicherung von Proteasevorstufen nach Zugabe der "Proformanreicherungssubstanzen" (bzw. T-Shift) vorlag oder falls eine Akkumulation erfolgte, die Proteasevorstufe inaktiv oder ihre Konzentration zu gering war, um eine Aktivitätserhöhung festzustellen.

3.10.3 Markierung in Anwesenheit der "Sekretionsinhibitoren"

Bei fast allen getesteten "Sekretionsinhibitoren" konnten Konzentrationen gefunden werden, bei denen die Proteaseausscheidung stärker vermindert war als das Zellwachstum, so daß von der intrazellulären Anhäufung einer (inaktiven) Proteasevorstufe ausgegangen werden konnte.
Um die Akkumulation einer Proform in der Zelle zu testen (Synthesehemmung war nicht auszuschließen), wurden Markierungsexperimente in Anwesenheit der "kritischen Konzentration" der "Proformanreicherungssubstanzen" durchgeführt. Hierzu wurde mit Wildtypzellen in TY-Medium und mit Cysteinmangelmutantenzellen in AS-GBM ohne Cys + Met gearbeitet und die dabei gewonnenen Zellextrakte, Zellüberstände und Gesamtkulturextrakte auf intrazellulären und extrazellulären Antigengehalt geprüft.

3.10.3.1 Markierung in TY-Medium

Zellen von S. marcescens ATCC 25419 wurden in TY-Medium bis in die späte logarithmische Phase (maximale Sekretion) gezüchtet und dann Aliquots der Kultur in Anwesenheit von 20 mM Procain, 20 mM Phenäthylalkohol, 5 mM TLCK, 1 mM EDTA, 10 mM NaN_3 und 0,1 mg/ml Rifampicin 15 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren markiert. Nach Aufschluß der Zellen und der TCA-gefällten Proben durch Kochen in SDS wurden mit den Zellüberständen, den Zellextrakten und den Kulturextrakten Immunfällungen durchgeführt und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Autoradiogramm (Abb. 39) ist zu sehen, daß aus allen Zellüberständen (außer dem EDTA-haltigen) 2 Proteine (Protease I und II) mit Antiserum ausgefällt wurden. Außer dem Auftauchen der Protease-bande nach Procainzugabe entsprach dies den aus den vorangegangenen Aktivitätsmessungen (3.10.1) abgeleiteten Erwartungen. Die Kontrolle und die NaN_3-Probe zeigten (ebenfalls erwartungsgemäß) die stärksten Proteasebanden im Überstand. In den Zellextrakten tauchten bei der PEA-Probe, der TLCK-Probe und der Rifampicin-Probe (etwas geringer) ebenfalls Antiserumfällbare Proteine auf. Hierbei handelte es sich bei den 3 Proben um ein Protein, das in Position der Protease II läuft (ca. 52.000 Dalton). Aus der Tatsache, daß die Zellen gründlich gewaschen waren und zumindest bei der PEA-Probe mehr Antigen im Zellextrakt als im Zellüberstand vorlag, wurde geschlossen, daß dieses Protein eine zellgebundene Proteaseform ist, die durch Zugabe der verschiedenen Substanzen nachweisbar wurde (durch Akkumulation). Zumindest nach PEA-Gabe lag auch unterhalb des 52 K Proteins eine Bande im Protease I-Bereich vor (Spalte C 7). Ob es sich hierbei um zellgebundene (inaktive) Protease I oder um während der Präparation aus dem 52 K Protein entstandene Protease I handelte, blieb unklar. Die Auftrennung der Immunpräzipitate der Gesamtkulturextrakte (Zellen und Überstand) ergab, daß bei allen Proben eine relativ starke Proteinbande ausgefällt worden war, wobei die Kontrolle die stärkste und die PEA- und Rifampicin-Proben die schwächsten Banden lieferten. Unter der Annahme, daß das gesamte Antigen aus dem Zellüberstand präzipitiert wurde (was der Vergleich der Kulturextraktbande mit der Überstandsbande bei der Kontrolle und der NaN_3-Probe bestätigte), kann geschlossen werden, daß die Proteinbanden aus den Kulturextrakten, die viel stärker als die aus den Zellüberstanden (außer Kontrolle und NaN_3-Probe) waren, die zellgebundene Proteaseform darstellen.

Somit würde außer durch PEA, TLCK und Rifampicin auch durch Procain und EDTA eine Proteaseform in der Zelle angehäuft werden. Die Tatsache, daß diese Bande in den Zellextrakten nicht oder nicht so stark ausgeprägt war, könnte auf Freisetzung des Proteins während der Waschvorgänge oder auf nicht vollständigen Zellaufschluß beruhen (s. 3.10.3.2).

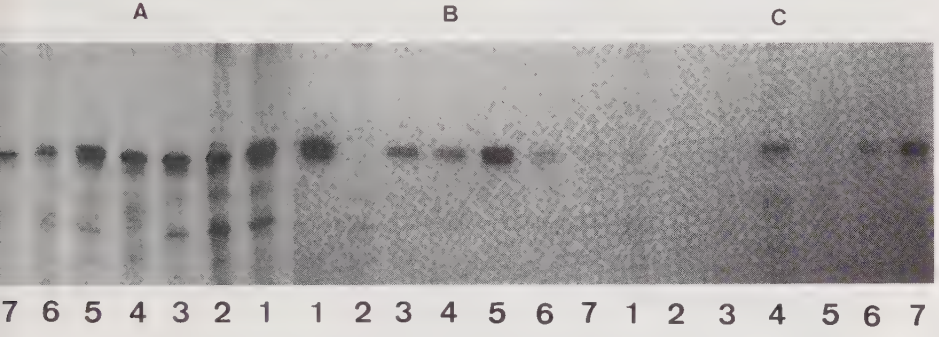

Abb. 39: Proformanreicherungsversuch in TY-Medium (Autoradiographie (14. T.)). Zellen von S. marc. ATCC 25419 wurden bis zur späten log-Phase (OD_{578} = 4,5) in TY-Medium gezüchtet. Aliquots der Kultur (mit je 1 x 10^9 Zellen) wurden dann 15 Min. lang in Anwesenheit der "Sekretionsinhibitoren" (s.u.) mit je 10 µCi ^{14}C-Aminosäuren (bzw. 45 µCi/ml Kultur) markiert. Der Puls wurde gestoppt: a) durch Eis und unmarkierte Aminosäuren (je 5 x 10^8 Zellen), zur getrennten Aufarbeitung der Zellpellets und der Zellüberstände und b) durch eiskalte TCA (10 % Endkonz.; je 5 x 10^8 Zellen) zur Gewinnung des Kulturextrakts. Die Zellen (aus a)) wurden sedimentiert, 3mal mit Tris/HCl-Puffer pH 8 (10 mM) gewaschen und wie die TCA-Niederschläge durch Kochen in SDS aufgeschlossen. Die Kulturextrakte (A), Zellüberstände (B) und Zellextrakte (C) wurden einer Immunfällung (2.11.3.2) mit anschließender Auftrennung der Präzipitate in der SDS-PAGE unterzogen. Eingesetzte Substanzen: Kontrolle (ohne Zusatz) (1), 1 mM EDTA (2), 20 mM Procain (3), 5 mM TLCK (4), 10 mM NaN_3 (5), 0,01 % Rifampicin (6), 20 mM PEA (7).

3.10.3.2 Markierung unter Cysteinmangelbedingungen

Die Wirkung der "Sekretionsinhibitoren" wurde auf die Proteasesekretion bei der Cystein-auxotrophen Mutante S. marcescens EN 6 in AS-GBM ohne Cys + Met getestet. Nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen wurden Aliquots der Kultur in Anwesenheit von 20 mM Procain, 20 mM PEA, 1 mM EDTA, 5 mM TLCK und 10 mM NaN_3 20 Min. mit ^{14}C-Aminosäuren markiert. Die Zellen wurden sedimentiert, 3mal gewaschen und durch Kochen in SDS aufgeschlossen. Die Zellextrakte und die entsprechenden Zellüberstände wurden einer Immunfällung unterzogen und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Aus den Zellüberständen war, wie in TY-Medium, bei allen Proben, außer der EDTA-haltigen, Protein ausgefällt worden, allerdings sehr viel weniger als bei der Kontrolle. Es handelte sich hierbei um Protease I und Protein III und im TLCK-haltigen Überstand war außerdem Protease II als dominante Bande zu erkennen (Abb. 40). Die Immunfällungen aus den Zellextrakten lieferten bei allen Proben eine Proteinbande, die auch in TY-Medium aufgetaucht war und in Position der Protease II lief. Besonders stark war dieses Protein nach Procain- und NaN_3-Gabe ausgeprägt, aber selbst bei der Kontrolle konnte eine schwache Bande erkannt werden. Da auch hier die Zellen gewaschen worden waren, kann die Zellständigkeit dieses Proteins nicht bezweifelt werden, zumal die Proteinbande nach Procainzugabe im Zellüberstand nicht auftauchte und aus dem Zellextrakt mehr Protein als aus dem Zellüberstand ausgefällt worden war. Durch dieses Experiment konnte die, nach dem Test der "Proformanreicherungssbustanzen" in TY-Medium, geschlossene Vermutung, daß alle Substanzen die Akkumulation eines Proteins (mit ca. 52.000 Dalton) in der Zelle bewirken, bestätigt werden. Selbst nach NaN_3-Zugabe, die in TY-Medium keine Sekretionshemmung ergab, konnte unter diesen Bedingungen eine zellgebundene Form nachgewiesen werden. Weiter konnte vermutet werden, daß durch alle getesteten "Proformanreicherungssubstanzen" mehr zellgebundenes Antiserum-fällbares Material angehäuft worden war als in der SDS-PAGE zu sehen war, da durch das Waschen der Zellen und das Aufschlußverfahren (zumindest nach Procain- und EDTA-Zugabe) ein Großteils des Proteins nicht erfaßt wurde: Cysteinmangelmutantenzellen wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen in Anwesenheit von 20 mM Procain und 1 mM EDTA 15 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren markiert und je gleiche Volumina der Kulturen nach TCA-Fällung, nach Sedimentation mit anschließend 3maligem Waschen aufgeschlossen. Der Zellüberstand, der

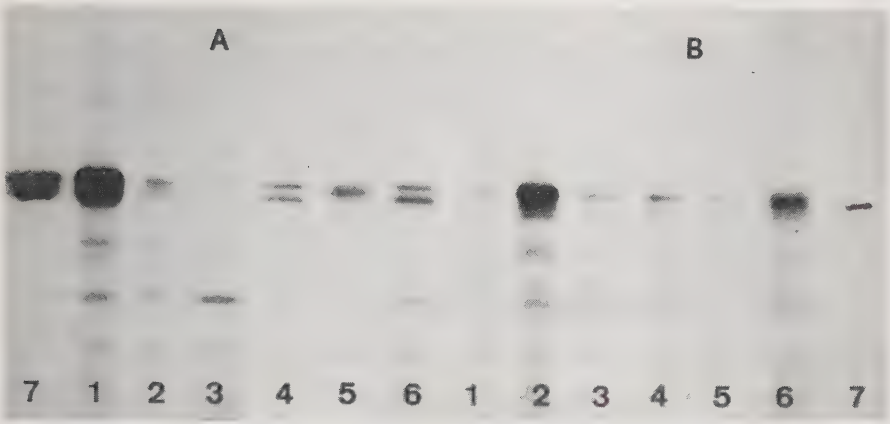

Abb. 40: Proformanreicherungsversuch in AS-GBM ohne Cys + Met (Autoradiographie 4 Wo.). Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (5 µCi/7,5 x 10^8 Zellen bzw. 20 µCi/ml Kultur) in Anwesenheit verschiedener Sekretionsinhibitoren (s.u.) 20 Min. lang markiert. Der Puls wurde durch Eis und unmarkierte Aminosäuren gestoppt, die Zellen (7,5 x 10^8) sedimentiert und nach 3maligem Waschen durch Kochen in SDS aufgeschlossen. Die Zellüberstände (A) und die Zellextrakte (B) wurden nach 2.11.3.2 immungefällt und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Eingesetzte Substanzen: Kontrolle ohne Zusatz (1), 20 mM Procain (2), 1 mM EDTA (3), 20 mM PEA (4), 5 mM TLCK (5), 10 mM NaN_3 (6), Protease I-Marker (7). In der linken Protease-Spalte (7) entspricht die untere Bande (^{14}C-Tusche) der Protease I, die darüberliegende Bande stammt von Spalte (1). Die starke Bande in Spalte (1) enthält Protease I und Protein III (bei kürzerer Exponierzeit).

Kulturextrakt, die beiden Zellextrakte und die 3 Waschlösungen wurden immungefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Autoradiogramm (Abb. 41) ist zu erkennen, daß bei beiden Proben aus den ungewaschenen Zellen weniger Protein mit Antiserum ausgefällt wurde als nach TCA-Fällung, aber deutlich mehr als aus den gewaschenen Zellen. In den Waschlösungen war so viel Protein unspezifisch ausgefallen, daß keine Aussage über die Freisetzung einer Proteaseform gemacht werden konnte. Bei beiden Proben wurden Proteine im Protease II- und I-Bereich entdeckt, wobei bei der EDTA-Probe die Bande in Protease I-Position auf "processing" während des Waschens zurückzuführen sein könnte. Da in diesem Experiment in den Zellüberständen keine

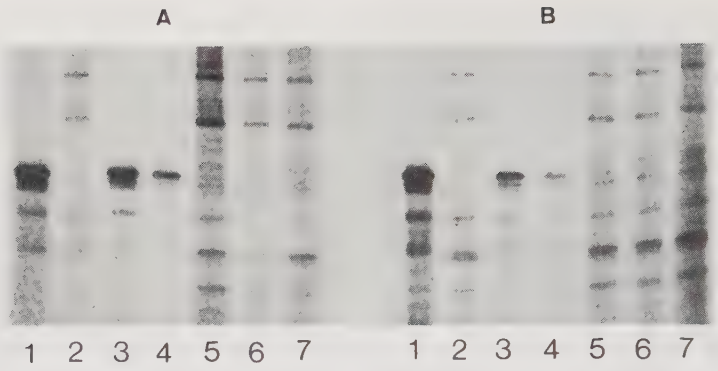

Abb. 41: Test der Proteasefreisetzung durch Waschen der Zellen (Autoradiogramm 8 Wo.). Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen 15 Min. lang in Anwesenheit von 20 mM Procain und 1 mM EDTA mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (5 µCi/7,5 x 10^8 Zellen bzw. 20 µCi/ml) markiert. Je 1/3 der Kulturen (mit 7,5 x 10^8 Zellen) wurde mit TCA gefällt, 1/3 der Kulturen wurde (nach Pulsstop durch Eis) sedimentiert und 3mal mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8) gewaschen und 1/3 der Zellen wurde nach Sedimentation ungewaschen durch Kochen in SDS aufgeschlossen. Der Kulturextrakt (1), der Zellüberstand (2), der Zellextrakt der ungewaschenen Zellen (3) und der gewaschenen Zellen (4) und die Waschlösungen (in Reihenfolge der Waschvorgänge: 5, 6, 7) wurden immungefällt (2.11.3.2) und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Procainprobe (A), EDTA-Probe (B).

Protease vorlag, konnte das Antigenmaterial nach TCA-Fällung als zellständig betrachtet werden, womit sichtbar wurde, daß ein Teil des intrazellulären Materials auch durch das Zellaufschlußverfahren (Kochen in SDS ohne vorherige TCA-Fällung) nicht erfaßt wurde.

3.10.4 "Pulse-chase"-Versuch

1) Durch Pulsmarkierungen in Anwesenheit der verschiedenen "Proformanreicherungssubstanzen" konnte ein zellgebundenes Protein nachgewiesen werden, das um ca. 1.000 Dalton größer war als die Exoprotease und mit Anti-Protese-Serum ausfällbar war. Ob es sich hierbei um eine Proteasevorstufe handelte, was zu vermuten war, wurde mit Hilfe eines "pulse-chase"-Versuches geprüft. Hierzu wurden spätlogarithmische Zellen von S. marcescens ATCC 25419 in TY-Medium in Anwesenheit von 30 mM Procain, 20 mM PEA, 5 mM TLCK,

1 mM EDTA, 0,02 % Rifampicin und 18 mM NaN_3 60 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren markiert (Puls). Die Proben wurden in je zwei Hälften geteilt und die Zellen nach Zugabe von unmarkierten Aminosäuren, Chloramphenicol und Eis sedimentiert. Ein Zellpellet wurde dann in Chloramphenicol- und unmarkierte Aminosäure-haltigem TY-Medium (doppeltes Ausgangsvolumen) aufgenommen und 90 Min. bei 30°C inkubiert ("chase"). Das andere Zellpellet wurde in eiskaltem GBM aufgenommen, sofort mit TCA gefällt und in SDS gekocht. Das "chase"-Pellet wurde nach Sedimentation wie das nach "pulse" behandelt und die Zellextrakte und die dazugehörigen Zellüberstände immungefällt und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. In Abb. 42 ist zu sehen, daß bei allen Proben aus dem Zellüberstand, außer nach EDTA- und PEA-Zugabe, Protease I und Protein III und aus allen Zellextrakten, außer bei der Kontrolle und nach EDTA-Zugabe, das 52 K Protein mit Antiserum ausfällbar war. Da bei der Kontrollkultur kein Antigen, weder in den beiden Zellextrakten noch im Zellüberstand, nach "chase" vorlag, konnte weiterlaufende Proteinsynthese während des "chase" ausgeschlossen werden und die im "Puls-Überstand" gefundenen Proteinbanden als gesamte synthetisierte Proteasemenge betrachtet werden. Die beste "Proformanreicherung" erfolgte nach TLCK-Zugabe (D). Die 52 K Bande war aber nicht in den Zellüberstand "chasebar", sondern blieb unverändert zellständig.

Ein ca. 50 proz. "processing"- und Freisetzungseffekt konnte allerdings bei der Rifampicin-haltigen Probe festgestellt werden, bei der ebenfalls relativ viel zellgebundenes 52 K Protein vorlag (G). Die Hälfte des angereicherten Proteins blieb während des "chase" zellgebunden, die andere Hälfte gelangte in den Zellüberstand und lief in SDS-PAGE schneller ("Molekulargewichts"-Differenz ca. 500 bis 1.000 Dalton), so daß es sich um die Protease I handeln sollte. Somit konnte eine zumindest teilweise Umwandlung und Freisetzung des zellgebundenen 52 K Proteins in die extrazelluläre Protease I nachgewiesen werden. Auch nach PEA-Zugabe (C) war relativ viel zellgebundenes Antigen zu erkennen, aber der größte Teil des Materials wurde nicht in das Medium freigesetzt, da im "chase"-Überstand nur eine sehr schwache Proteinbande, in gleicher Position wie die zellgebundene Form, entdeckt wurde. Bei NaN_3 (F) und Procain (E) im Ansatz war relativ viel Protein in den Zellüberstand "gechased" worden, allerdings konnte auch hier kein Größenunterschied zur zellgebundenen Form festgestellt werden. Nach EDTA-Zugabe war in diesem Experiment keine zellgebundene Proteaseform zu entdecken.

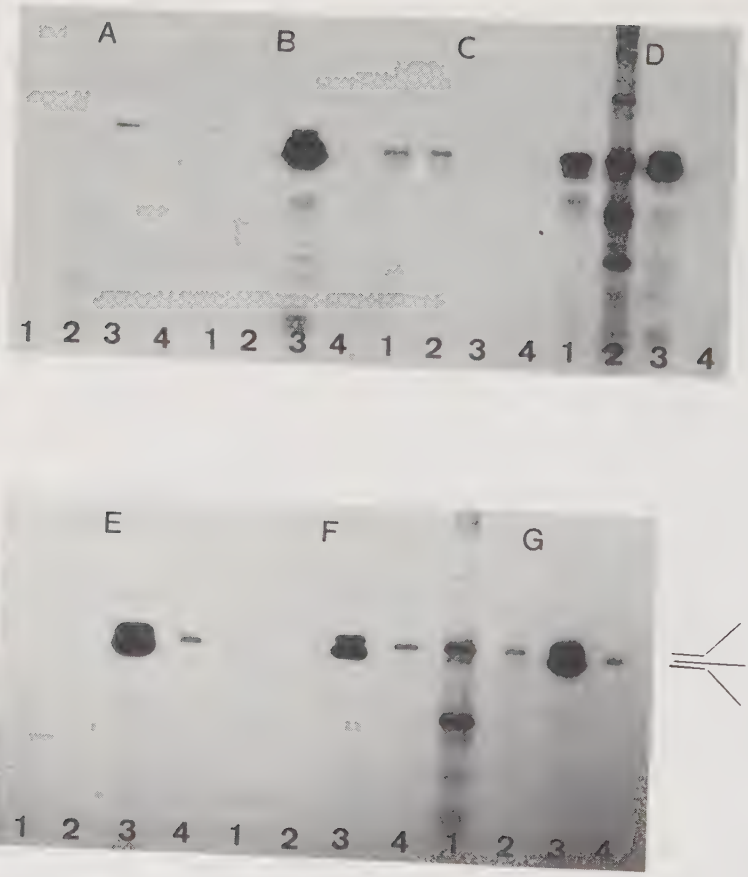

Abb. 42: "Pulse-chase"-Versuch in Anwesenheit verschiedener "Sekretionsinhibitoren". Autoradiographie (2 Wo). Der Versuch wurde wie in 2.16.5.2 angegeben durchgeführt. Eingesetzte Substanzen: 1 mM EDTA (A), Kontrolle (B), 20 mM PEA (C), 5 mM TLCK (D), 30 mM Procain (bei (1) wurde nur ca. 1/3 der Probe im Gel aufgetragen) (E), 18 mM NaN_3 (F), 0,02 % Rifampicin (G). Zellextrakt: 60 Min. Puls (1), 90 Min. "chase" (2); Zellüberstand: Puls (3), "chase" (4).

Insgesamt konnte der Effekt der "Sekretionsinhibitoren" nochmals bestätigt werden, wobei im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten mehr Protein angehäuft wurde, was am besseren Aufschlußverfahren (mit vorangegangener TCA-Fällung) und wohl hauptsächlich durch die längere Markierungsdauer bedingt war.
Die Tatsache, daß die Umwandlung des 52 K Proteins in die Protease I nur nach Pulsmarkierung in Anwesenheit von Rifampicin erfolgte, dem einzigen Inhibitor also, der nicht direkt den Sekretionsmechanismus (auf Membranebene) blockieren sollte, läßt vermuten, daß eine sehr empfindliche Exportmaschinerie vorliegt. Für die "Nicht-chasebarkeit" des 52 K Proteins nach Anhäufung durch TLCK und PEA, dessen Effekt in der hier benutzten Konzentration bei E. coli als reversibel beschrieben ist (27, 34, 113), gibt es mehrere Möglichkeiten: 1) Der 60 Min.-Puls könnte zu lang gewesen sein, so daß das 52 K Protein,wie bei der Proform des M13-Hüllproteins beobachtet (46), denaturiert vorlag, oder 2) daß der Inhibitoreffekt nicht mehr reversibel war. 3) Die Inhibition des "processing"-Schrittes könnte a) eine Konfigurationsänderung bewirken, die eine weitere proteolytische Spaltung verhindert oder b) die Umgebung des Proteins oder seine Lokalisation so beeinflussen, daß es der Signalpeptidase räumlich nicht mehr zugänglich ist. 4) Die Signalpeptidabspaltung könnte streng an die Synthese gekoppelt sein, wie dies z.B. für die Amp C ß-Lactamase gezeigt wurde (66).
Das nach Pulsmarkierung in Anwesenheit von NaN_3 und Procain während des "chase" freigesetzte Protein, das mit 52.000 Dalton die Protease II sein könnte, ist vermutlich "unprocessiertes" durch Lyse freigesetztes 52 K Protein. Hierfür spricht, daß zumindest nach NaN_3-Gabe Lyse wahrscheinlich war und daß extrazellulär Protease I oder Protein III, nicht aber Protease II zu erwarten war. Auch sollte Procain den gleichen Effekt wie TLCK oder PEA haben, so daß aus obigen Gründen die Signalpeptidabspaltung wohl nicht erfolgte. Eine aktive Freisetzung des 52 K Proteins wird nicht angenommen, ist aber nicht auszuschließen.
2) Nach der Pulsmarkierung waren die Zellüberstände, deren Zellpellet für den "chase" benutzt worden waren, eingefroren worden. Eine später durchgeführte Immunfällung und SDS-PAGE ergaben, daß aus diesen Überständen, die mit denen nach Puls aus Abb. 42 identisch waren, nur Protease I ausfällbar war, während die Gesamtmenge des ausgefällten Proteins dem der

"Pulsüberstände" aus Abb. 42 entsprach (Abb. 43). Auch wenn außer dem Einfrieren der Proben kein Unterschied in der Bearbeitung zu denen der "Pulsüberstände" entdeckt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß beim "pulse-chase"-Experiment die Protease I während der Präparation in Protease III überging (ein Effekt des Einfrierens war unwahrscheinlich). Die Aufspaltung oder Modifizierung der Protease I kann somit außer im Medium, wie oben gezeigt (Abb. 32) eventuell auch während der Präparation der gewonnenen Überstände erfolgen. Auch diese Beobachtung bestätigt die oben besprochenen Pulsmarkierungen (Abb. 32 und 33), in denen die Protease I als erstes der verschiedenen Proteasemoleküle im Zellüberstand vorliegt. Der Übergang von Protease III in Protease I nach Einfrieren des Zellüberstandes war nach allen bisherigen Ergebnissen auszuschließen.

Abb. 43: Immunfällung aus TY-Überstand nach Pulsmarkierung in Anwesenheit verschiedener Sekretionsinhibitoren (Autoradiographie 4 T.). Die Zellüberstände entsprechen denen aus Abb. 42, wurden aber vor der Immunfällung bei -20°C gelagert. Immunfällung aus Zellüberstand nach 1 Std. Pulsmarkierung in Anwesenheit von: 20 mM PEA (1), 0,02 % Rifampicin (2), 5 mM TLCK (3), 18 mM NaN_3 (4), 30 mM Procain (5), 1 mM EDTA (6), Kontrolle (7).

3) Um die Wirkung der verschiedenen "Sekretionsinhibitoren" auf den Einbau der ^{14}C-Aminosäuren in Proteine zu testen, wurde jeweils 5 Min. vor Puls- und "chase"-Ende ein Aliquot der Kultur auf radioaktiv markiertes TCA-fällbares Material (wie in 2.16.1 beschrieben) untersucht. Aus Tab. 6 geht hervor, daß alle eingesetzten Hemmstoffe eine Verminderung des ^{14}C-Einbaus verursachen. Hierbei ist keine direkte Korrelation zwischen Protease-Antigengehalt (nach der SDS-PAGE) und Einbaurate (was auch nicht zu erwarten ist, da die Gesamtproteinbiosynthese gemessen wurde) wohl aber eine gewisse Korrelation zwischen Zellwachstum (s. Abb. 31 - 38) und Einbaurate, Rifampicin und NaN_3 ausgenommen, festzustellen. Während des "chase" nimmt bei allen Proben, außer der Rifampicin-Probe, die Menge an ^{14}C-TCA-fällbarem Material ab, woraus zu schließen ist, daß Proteinabbau während der Chloramphenicol-Inkubation erfolgt war. Der gleiche Effekt

Tab. 6: Einbau von ^{14}C in TCA-fällbares Material nach "pulse" und "chase" in TY-Medium unter Einwirkung verschiedenener Sekretionsinhibitoren.

Probe	TCA-fällbares Materila (%) Puls (55 Min.)	"chase" (85 Min.)
Kontrolle	100	67,4
EDTA (1 mM)	84,4	43,8
TLCK (5 mM)	71,4	34,1
Proc (30 mM)	67,8	41,3
Rif (200 µg/ml)	43,5	48,2
PEA (20 mM)	35,9	25,2
NaN_3 (18 mM)	21,4	17,5

wurde auch im "pulse-chase"-Versuch mit ^{35}S-Methionin (s. Abb. 27B) festgestellt, bei dem innerhalb 1 Std. "chase" die freie Radioaktivität im Zellüberstand von 37,5 % auf 72,5 % anstieg. Es besteht die Möglichkeit, daß dieser Proteinabbau im Zusammenhang mit der "Nicht-chasebarkeit" des 52 K Proteins in die Protease I steht, zumal bei der Rifampicin-Probe kein Proteinabbau festgestellt wurde.

3.10.5 Partielle Proteolyse

Die Verwandtschaft des zellgebundenen 52 K Proteins mit den Proteasen des Zellüberstandes wurde über das Spaltproduktmuster nach V8-Protease-Behandlung während der Elektrophorese bestätigt. Die Proteinbande, die nach TLCK-Behandlung zellgebunden vorlag, lieferte nach Proteaseverdau ähnliche Spaltprodukte wie die in der gleichen Probe befindlichen Proteine (Protease I und Protein III) des Zellüberstandes (Abb. 44). Somit steht außer Zweifel, daß das 52 K Protein, das nach Einsatz verschiedener "Proformanreicherungssubstanzen" intrazellulär angehäuft wird und mit Anti-Exoprotease-Serum fällbar ist, eine Proteasevorstufe oder zumindest eine temporär zellgebundene Proteaseform oder Zwischenform ist, auch wenn die Proform-Produkt-Beziehung bzw. die Freisetzung in das Medium im "pulse-chase"-Versuch nicht in allen Fällen nachweisbar war. Unter den Spaltprodukten des zellgebundenen 52 K Proteins fiel kein Pep-

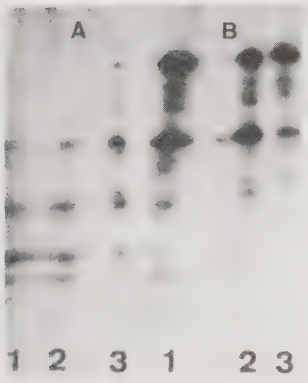

Abb. 44: Partielle Proteolyse: Vergleich der Spaltproduktmuster nach V8-Proteaseverdau der zellgebundenen 52 K Proteaseform mit denen der extrazellulären Protease I und Protein III. Die Spaltung während der Elektrophorese erfolgte wie in 2.10.2 beschrieben. Es wurden 100 µg (A) und 5 µg (B) V8-Proteine eingesetzt. Protease I (1), Protein III (2), 52 K Protein (3).

tid auf, das aufgrund eines zusätzlichen Signalpeptids eine ca. 1.000 Dalton höhermolekulare Bande als die in vergleichbarer Position laufende Bande der Überstandsproteine lieferte, so daß die partielle Proteolyse im Gel keinen direkten Hinweis auf den Proformcharakter der zellgebundenen Proteaseform lieferte.

3.10.6 Lokalisation des zellgebundenen 52 K Proteins

Zellen von S. marc. ATCC 25419, die in TY-Medium nach Gabe von 30 mM Procain, 20 mM PEA, 1 mM EDTA und 5 mM TLCK 25 Min. mit ^{14}C-Aminosäuren markiert worden waren, wurden in Anwesenheit der jeweiligen Substanz (Hemmung des "processing"-Schrittes) und von Orthophenanthrolin (Hemmung entstehender oder vorhandener Protease) mit Ultraschall aufgeschlossen. Die jeweilige Membranfraktion, die durch Zentrifugation bei 100.000 xg von der löslichen Fraktion getrennt worden war, wurde mit Triton X-100 inkubiert, um die Proteine der inneren Membran zu lösen. Nach einer zweiten

Zentrifugation (100.000 xg) wurden die Proteine der äußeren Membran durch Kochen in SDS gelöst und alle gewonnenen Zellfraktionen einer Immunfällung mit anschließender SDS-PAGE unterzogen. Im Autoradiogramm (Abb. 45) konnte bei der TLCK-Probe das 52 K Protein in der inneren Membran und z.T. in der löslichen Fraktion (Spalte 3+4, A) wiedergefunden werden, woraus zu schließen ist, daß das Protein entweder an der Außenseite der Cytoplasmamembran sitzt oder nur lose in oder an der Cytoplasmamembran gebunden ist. Nach

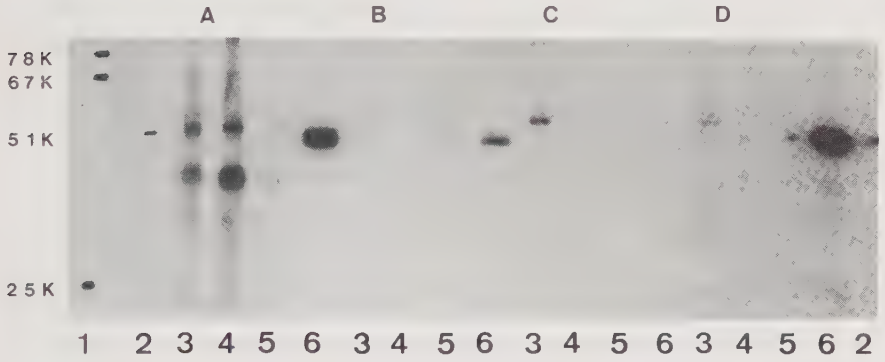

Abb. 45: Lokalisation des zellgebundenen Proteaseantigens (Autoradiographie 4 Wo.). Spätlogarithmische in TY-Medium gezüchtete Zellen von S. marc. ATCC 25419 wurden nach Zugabe von verschiedenen Sekretionshemmern (s.u.) 25 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (12 µCi/2,7 x 10^9 Zellen bzw. 20 µCi/ml Kultur) markiert, sedimentiert (je 2,7 x 10^9 Zellen) und in Anwesenheit der verschiedenen Hemmstoffe und von OPA mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Membranfraktion und die lösliche Fraktion wurden durch Zentrifugation bei 100.000 xg gewonnen und durch Inkubation der Membranfraktion mit Triton X-100 die Proteine der inneren Membran von der der äußeren Membran (100.000 xg, Kochen in SDS) getrennt. Die verschiedenen Zellfraktionen und je 1/3 der dem Zellgehalt entsprechenden Zellüberstände wurden immunpräzipitiert und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Eingesetzte Hemmstoffe: 5 mM TLCK (A), 30 mM Procain (B), 1 mM EDTA (C), 20 mM PEA (D); Zellkompartimente: lösliche Fraktion (3), innere Membran (Triton X-100 lösliche Fraktion) (4), äußere Membran (5), Zellüberstand (6). Eichproteine wie in 2.10.1 angegeben (1), Exoproteasemarker (2), Molekulargewichtsangabe (Dalton) in Einheiten von Tausend (K = Kilo).

Procain-, EDTA- und PEA-Gabe war aus der löslichen Fraktion (Spalte 3, B, C, D) ein Protein mit Antiserum ausgefällt worden, dessen Molekulargewicht ca. 55.000 Dalton betrug und demnach um 4.000 Dalton höher war als das der Exoprotease. Dieses Protein war in früheren Markierungsexperimenten öfters unspezifisch, also auch ohne Antiserumgabe, aus dem Zellüberstand ausgefallen und war besonders häufig nach EDTA-Gabe (nach langer Exponierzeit) zu finden (s. Abb. 42). Auch tauchte es nach langer Exponierzeit im Zellüberstand (Immunfällung) der Proteasemangelmutante auf, nicht aber in den Zellextrakten nach Procain-, EDTA- und PEA-Zugabe, so daß seine Proteaseverwandtschaft bezweifelt werden muß. Da in diesem Experiment und auch bei der EDTA-Probe aus Abb. 42 keine sonstigen "Fremdproteine" auftauchten, ist aber dennoch nicht auszuschließen, daß es sich nicht doch um eine Proteaseform handeln kann, die dann um 4.000 Dalton größer wäre als die reife Protease. Bei der PEA-Probe (D) fiel in allen Zellfraktionen ein Protein auf, das in Protease I-Position lief. Da nach PEA-Gabe sehr viel Exoprotease im Zellüberstand vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Protein eine "Überstandverunreinigung" ist. Wäre die Umwandlung des 52 K Proteins in die Protease I während der Präparation erfolgt, dann würde PEA die Anreicherung des Antigens in allen getesteten Zellkompartimenten bewirken. Das 52 K Protein konnte somit nur nach TLCK-Gabe in der löslichen Fraktion und in der inneren Membran (bzw. Triton X-100-löslichen Fraktion) wiedergefunden werden. Die nach PEA-Gabe in allen Zellkompartimenten gefundene Proteinbande kann nicht eindeutig als zellgebunden betrachtet werden und das 55 K Protein nach Procain-, EDTA- und PEA-Zugabe (in der löslichen Fraktion) wurde aufgrund früherer Daten als nicht "Protease-verwandt" angesehen, wobei dieses nun in Frage zu stellen ist. Eventuell existiert doch noch eine weitere Proteaseform, deren Molekulargewicht um ca. 4.000 Dalton größer als das der Exoprotease ist. Wieso dieses Protein dann nicht aus den Zellextrakten fällbar war, bleibt ungeklärt.

3.11 Versuche bei verzögerter Sekretion

3.11.1 Pulsmarkierungsversuche

Bei der Cysteinmangelmutante konnte, wie in Abb. 24 und 40 zu sehen ist, ohne vorherige Anreicherung mit Hilfe von Sekretionsinhibitoren (besonders durch Procain und NaN_3) keine bzw. im Vergleich zur ausgeschiedenen Proteasekonzentration nur sehr geringe Mengen an zellgebundenem Antigen gefunden werden. Hieraus und auch aufgrund des Pulsmarkierungsversuches, bei dem schon nach 15 Sek. Protease im Zellüberstand auftauchte (s. Abb. 32), war zu schließen, daß unter normalen Inkubationsbedingungen im AS-GBM ohne Cys + Met, wie auch im TY-Medium (s. Abb. 35) synthetisierte Protease sofort in das Medium ausgeschieden wird. In einem Pulsmarkierungsversuch, bei dem die Cystein-auxotrophe Mutante nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen 15 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuren markiert worden war, fiel auf, daß nur im Zell- und Kulturextrakt, nicht aber im Zellüberstand Antiserum-fällbares Material vorhanden war (Abb. 46). Demnach war es hier ohne Einsatz von "Sekretionsinhibitoren" zu einer Anhäufung des zellgebundenen 52 K Proteins gekommen. Der Vergleich

Abb. 46: Akkumulation des 52 K Proteins ohne Sekretionsinhibitorgabe (Autoradiographie 10 T.). Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) 15 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (4,5 µCi/7,5 x 10^8 Zellen bzw. 20 µCi/ml Kultur) markiert. Die Hälfte der Kultur (7,5 x 10^8 Zellen) wurde mit TCA gefällt, die andere Hälfte in Eis gestoppt und die Zellen ungewaschen in kochendem SDS aufgeschlossen. Der Kulturextrakt (1), der Zellüberstand (2) und der Zellextrakt (3) wurden nach Immunfällung (2.11.3.2) in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

der ausgeschiedenen Proteasemenge (unmarkierte Proteine) unter diesen Bedingungen mit der nach erfolgter "normaler" Induktion (aus Sicht der Proteasefreisetzung) ergab, daß die Proteasekonzentration im Zellüberstand

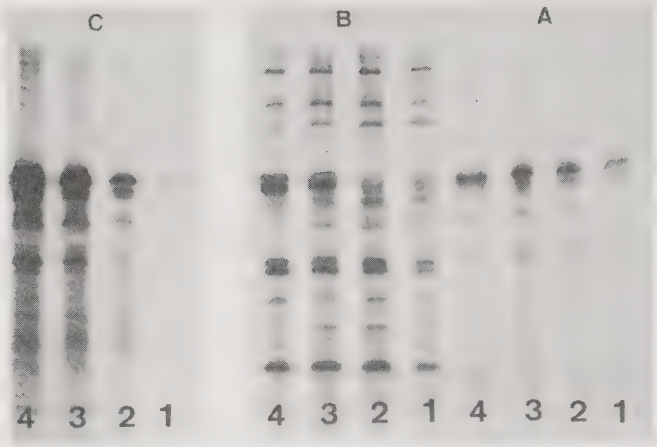

Abb. 47: Pulsmarkierung bei verzögerter Sekretion (Autoradiogramm 4 Wo.). Zellen von S. marc. EN 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangelbedingungen (2.4.2) mit ^{14}C-Aminosäuren (10 µCi/ 1,5 x 10^9 Zellen bzw. 25 µCi/ml Kultur) markiert und der Puls nach verschiedenen Intervallen (s.u.) 1) durch Eis und unmarkierte Aminosäuren und 2) durch TCA-Fällung gestoppt (je 1,5 x 10^9 Zellen). Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen wie die TCA-Pellets in SDS gekocht und die Kulturextrakte, Zellextrakte und die dazugehörigen Zellüberstände immungefällt (2.11.3.2) und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zellextrakte (A), Zellüberstände (B), Kulturextrakte (C). Pulsintervalle: 0,5 Min. (1), 1,5 Min. (2), 5 Min. (3), 15 Min. (4).

bis zu 90 % vermindert war. Der Nachweis des zellgebundenen Materials ließ erkennen, daß nicht nur die Proteaseinduktion (Synthese), sondern besonders die Sekretion betroffen sein mußte. Pulsmarkierungsversuche unter diesen Bedingungen (verzögerte Sekretion) ergaben, daß das 52 K Protein das erste aus Zellextrakten mit Anti-Exoprotease-Serum fällbare Protein ist. In Abb. 47A+B ist zu sehen, daß intrazellulär schon nach dem kürzesten Pulsintervall (30 Sek.) das 52 K Protein vorlag, dessen Intensität bis zu 5 Min. anstieg, während aus Zellüberstand erst nach 5 Min. deutlich Protease I und Protein III fällbar war. Auch nach Immunfällung aus dem Gesamtkulturextrakt (C) war zu erkennen, daß zuerst nur das 52 K Protein (30 Sek. Puls) vorlag, bevor ober- und unterhalb Proteinbanden sichtbar wurden. Hierbei fiel auf, daß das Protein III scheinbar direkt aus dem 52 K Protein her-

vorging (C, Spalte 3+4), da erst nach 15 Min. zwei in der Originalautoradiographie deutlich voneinander getrennte Proteinbanden vorlagen. Es wäre demnach nicht auszuschließen, daß das Protein III, unter diesen Bedingungen, direkt aus dem zellgebundenen 52 K Protein hervorgeht (und dabei in das Medium freigesetzt wird) und nicht, wie im TY-Medium gezeigt, erst im Zellüberstand aus der Protease I entsteht. Da aber die Protease II, die die Zwischenform bei der Protein III (bzw. Protease III)-Entstehung ist, in gleicher Position wie das zellgebundene 52 K Protein läuft, kann angenommen werden, daß auch bei verzögerter Sekretion der gleiche Sekretionsmechanismus vorliegt wie unter normalen Wachstumsbedingungen.

3.11.2 "Pulse-chase"-Versuch

Die Vorläufer-Produkt-Beziehung des 52 K Proteins zur Protease I bzw. Protein III wurde mit Hilfe eines "pulse-chase"-Versuchs geprüft. Unter den in 3.11.1 angegebenen Bedingungen wurde 1 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch pulsmarkiert und nach verschiedenen "chase"-Intervallen (in Anwesenheit von unmarkierten Aminosäuren und Chloramphenicol) jeweils Zellextrakte, Zellüberstände und Gesamtkulturextrakte (TCA-gefällt) gewonnen. Nach Immunfällung und SDS-PAGE war selbst nach 8 Wochen Exponierzeit bei den Präzipitaten aus den Zellextrakten und -überständen nur sehr schwache Proteinbanden zu erkennen, weshalb auf die Darstellung verzichtet wird. Allerdings war zu sehen, daß das zellgebundene Antigen während des "chases" abnahm und im Zellüberstand erst nach 20 Min. Protein auftauchte, so daß die aus dem Gesamtkulturextrakt ausgefällten Proteaseformen bis zu ca. 20 Min. zellgebundene Antigene repräsentieren (Abb. 48). Man sieht, daß bis zu 20 Min. (Spalte 6) das 52 K Protein die dominante Bande darstellt und ab 60 Min. verschwunden ist. Ab 10 Min. "chase" (Spalte 5) ist das Protein III zu erkennen, welches bis zu 60 Min. an Intensität zunimmt. Auffällig ist das Proteingemisch unterhalb der 52 K Bande, so daß nicht eindeutig geklärt werden kann, ab wann die Protease I entsteht, die nach 120 Min. "chase" (Spalte 9) neben dem Protein III als einzige Proteinbande vorliegt. Da das Proteingemisch im Laufe des "chase" (zumindest bis zu 30 Min., Spalte 7) nicht abnahm oder in kleinere Proteinbanden überging, kann ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Spaltprodukte handelt. Man könnte vermuten, daß es nicht fertig synthetisierte Pro-

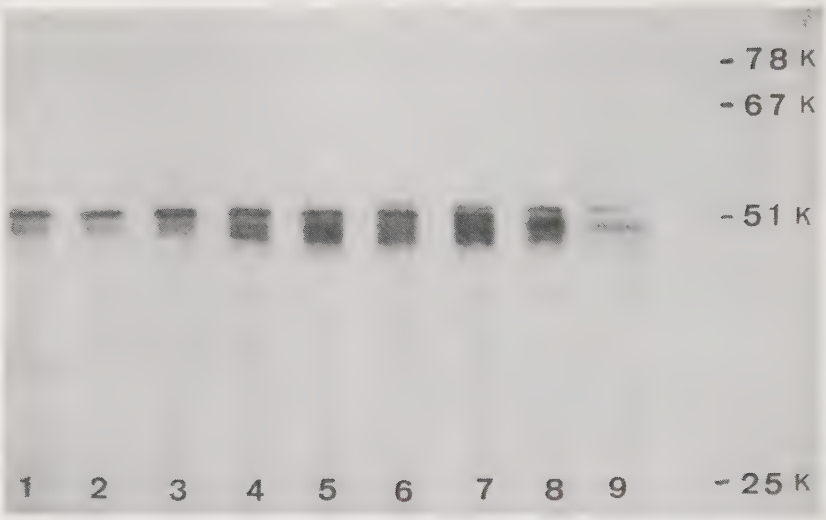

Abb. 48: "Pulse-chase"-Versuch bei verzögerter Sekretion (Autoradiogramm 8 Wo.). Zellen von S. marc. E N 6 wurden nach 2,5 Std. Inkubation unter Cysteinmangel (2.4.2) 1 Min. lang mit ^{14}C-Aminosäuregemisch (4 µCi/5,4 x 10^8 Zellen bzw. 22 µCi/ml Kultur) markiert und der "chase" durch Zugabe von unmarkierten Aminosäuren und Chloramphenicol eingeleitet. Der "chase" wurde nach verschiedenen Intervallen (s.u.) durch Fällung der Kultur (mit je 5,4 x 10^8 Zellen) mit TCA gestoppt und die Zellextrakte (nach Kochen in SDS) immungefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. "chase"-Intervalle: 0 Min. (= 1 Min. Puls) (1), 0,5 Min. (2), 1 Min. (3), 3 Min. (4), 10 Min. (5), 20 Min. (6), 30 Min. (7), 60 Min. (8), 120 Min. (9). Eichproteine wie in 2.10.1 angegeben (K = Kilo).

teasemoleküle sind, wogegen allerdings die Intensitätszunahme trotz Chloramphenicolzugabe spricht. Auch könnten es Zwischenformen während der Protease I-Entstehung oder verschiedene "Ladungsformen" des Proteins sein, wobei die letzteren allerdings vorher nie aufgetaucht waren.

Dieser Versuch bestätigt nochmals, daß das erste (nachweisbare) mit Anti-Exoprotease-Serum fällbare Syntheseprodukt 52.000 Dalton groß ist (bzw. eine Proteinbande in dieser Position in der SDS-PAGE liefert) und zellgebunden vorliegt. Aus diesem Protein gehen die Proteine, die im Zellüberstand nachweisbar sind, Protease I, II und III, hervor. Da das 52 K Protein quantitativ in die reifen Proteasen überführbar war, kann davon ausgegangen werden, daß es sich um eine echte Vorstufe handelt.

4. DISKUSSION

Proteasen des Zellüberstandes

Die Protease I, die von S. marcescens ATCC 25419 aktiv (ohne Zellyse) in das Medium ausgeschieden wird, stellt bis zur stationären Phase die dominante Proteinbande des Zellüberstandes dar (Abb. 1 und 2). Ab der stationären Phase läßt sich die Protease II aus Zellüberstand mit Anti-Exoprotease-Serum ausfällen. Die Menge dieses Proteins, das in der SDS-PAGE oberhalb der Protease I (51.000 D) mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 52.000 Dalton läuft, nimmt mit fortschreitender Zellyse zu. In der späten Absterbephase taucht ein weiteres immunfällbares Protein, die Protease III, dessen Größe nach der SDS-PAGE 53.000 Dalton beträgt, in geringer Konzentration im Medium auf (Abb. 2). Die Immunfällbarkeit der Protease II, ihr um ca. 1.000 Dalton (scheinbar) höheres Molekulargewicht und ihr mit der Protease I identisches Peptidmuster nach Protease V8-Verdau, bei dem zumindest ein Spaltprodukt den Größenunterschied wiederspiegelt (Abb. 3), führte zu der Annahme, daß es sich bei Protease II (und III) um eine Proteasevorstufe oder höhermolekulare zellgebundene Proteaseformen handelt, die eventuell durch Zellyse freigesetzt werden. Schon die Tatsache, daß die "höhermolekularen" Proteine erst nach der Hauptsekretionsphase im Medium auftauchten und dort stabil vorlagen, ließ vermuten, daß diese "Proformen" normalerweise nicht im Zellüberstand in die reife Form umgewandelt werden. Ein solcher Reifungsprozeß wäre nur dann sinnvoll gewesen, wenn sie vor oder während der Sekretionsphase in das Medium gelangt wären, wie dies z.B. für die exolarge-Form der Penicillase von B. licheniformis (63) und die Vorstufe einer der Exoproteasen von S. aureus V8 (36) beschrieben ist. Auch schied die Möglichkeit aus, daß die Protease I und II zellgebundene Proteaseformen sind, aus denen die Protease I hätte entstehen können, wie dies für einige extrazelluläre Proteine (5, 10, 63, 64, 86) angenommen oder bewiesen ist, da im Protease II-Freisetzungsexperiment (s. 3.3) keine proteolytische Aktivität in den Zellüberstand gelangte.

Gegen den Vorstufencharakter der Protease II sprachen die Teilsequenzanalysen (s. 3.2.7) der über DEAE-Cellulose-Chromatographie rein isolierten Protease I und II (s. 3.2). Der Edman-Abbau liefert so geringe Ausbeuten (kleiner 15 %), daß nicht auszuschließen ist, daß beide Pro-

teine N-terminal blockiert sind. (Ein N-terminaler Block wäre bei N-Formyl-Methionin als 1. Aminosäure der Proform erwartet worden). Es wird aber vermutet, daß die in Abb. 15 wiedergegebene Sequenz den für Protease I und Protease II identischen N-Terminus darstellt, da davon ausgegangen wird, daß die geringe Ausbeute auf Materialverlust beruht. Die bei beiden Proteasen gefundene Heterogenität am Aminoende mit der Ala-Ala-Thr-Komponente bei Protease II könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei der Proteasevorstufe 2 oder mehrere Alaninreste am Ende des Signalpeptids sitzen, so daß die Signalpeptidase diese Reste nicht genau unterscheidet. Alanin wurde bei allen bisher untersuchten Proformen mit Ausnahme von Lipoproteinvorstufen im Signalpeptidspaltungsbereich (meist als letzte Aminosäure des Signalpeptids) gefunden, wobei gehäuft die Spaltung zwischen 2 Alaninresten erfolgt (Zusammenstellung, Ref. 90). Gegen diese Vermutung spricht allerdings, daß im gleichen Protease I-Präparat die Heterogenität unterschiedlich stark war und die Ala-Ala-Thr-Komponente nach Lagerung der Probe überwog. Eine nachträgliche proteolytische Abspaltung des einen Alaninrestes ist somit auszuschließen und die Heterogenität eventuell auf Ungenauigkeiten der Sequenzläufe zurückzuführen. Die C-terminale Sequenzanalyse mit Carboxypeptidase A bestätigte die starke Verwandtschaft der Protease I und II. Bei beiden Proteasen war die Reihenfolge der freigesetzten Aminosäuren in verschiedenen Spaltungen identisch (s. 3.2.6). Ob der auffällig hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren eine "aktive" Rolle bei der Sekretion des Proteins spielt, ist ungewiß, zumal solches in der Literatur bisher nicht beschrieben ist.

Da die Protease II- und III-Freisetzung nicht wie angenommen durch Zelllyse erfolgte (s. 3.3), wurde ihre Entstehung im Zellüberstand untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß ihr Auftauchen auf die Alkalisierung des Mediums zurückzuführen ist (s. 3.4). In Inkubationsexperimenten mit Zellüberstand oder gereinigten Proteasen erfolgte eine Umwandlung der Protease I in Protease II bei pH-Werten oberhalb 8. Auch durch Erhitzen auf 95°C konnte dieser Effekt festgestellt werden. Die Aufspaltung der Protease II in die Protease III war allerdings nicht so eindeutig, wobei zu beachten ist, daß auch im normalen TY-Überstand die Menge an Protease III relativ gering ist (Abb. 2). Am einfachsten ließe sich die Protease II- und III-Entstehung im Zellüberstand durch Hydro-

lyse (mit Alkali oder bei 95°C) der Säureamide Glutamin und Asparagin in die jeweiligen Monoamino-dicarbonsäuren erklären. Für die Desaminierung spricht, daß mit Zunahme der "Größe" der Proteasen eine höhere DEAE-Affinität festzustellen war, d.h. der saure Charakter mit der langsameren elektrophoretischen Beweglichkeit korreliert. Die Protease II (und III)-Entstehung durch echte Modifikation (z.B. Glykolisierung) ist unwahrscheinlich, da ihre Bildung auch in reinem Puffer aus gereinigter Protease I erfolgt (Abb. 19). Auch ist proteolytische Spaltung bei der Umbildung der Proteaseformen nicht beteiligt, da reine Protease I trotz Hemmung durch OPA in Protease II übergeht (Abb. 20). Da die Protease II (und III) von der Aminosäureanzahl im Molekül die gleiche molekulare Größe wie die Protease I besitzen, ist ihr Laufverhalten in der SDS-PAGE als abnormal zu betrachten und sollte auf die Ladungsunterschiede zurückzuführen sein. Die langsamere Beweglichkeit könnte auf den unterschiedlichen Grad der SDS-Bindung der jeweiligen Proteine und/oder auf eine veränderte Konfiguration der Proteasen oder der SDS-Proteasekomplexe beruhen. Die innermolekulare Umstrukturierung der Protease I beeinflußt das aktive Zentrum nicht, da zumindest bei Protease II noch eine gleich hohe spezifische Aktivität festgestellt wurde (Tab. 2). Allerdings könnte sie die Ursache für die höhere Instabilität der Protease II sein, die sich während der Isolierungsschritte durch Denaturierung (besonders bei Dialysen) zeigte (Tab. 1 und 2). Die beobachtete N-terminale Heterogenität könnte ebenfalls (wenn sie tatsächlich vorliegt) das Laufverhalten der Proteasen beeinflussen. Abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE ist für mehrere Proteine(klassen) in der Literatur beschrieben (35). Die bekanntesten sind Glykoproteine, basische Proteine und hitzemodifizierbare Proteine. Eine Verbindung zur Protease ist hierbei nicht festzustellen. Ein mit der Protease vergleichbares Verhalten, d.h. langsamere elektrophoretische Beweglichkeit mit Zunahme der Ladung wurde z.B. für die exolarge-Form der Exopenicillase von B. licheniformis (63) und für die Mutante von S. typhimurium, die eine einzige Aminosäuresubstitution im hisJ-Gen trägt (103), gezeigt.

Kreger beschreibt die hier untersuchte Exoprotease als mikroheterogen, da sein isoliertes Präparat 3 bis 4 eng beieianderliegende Proteinbanden in der SDS-PAGE liefert (78). Es wird vermutet, daß es sich hierbei um die hier identifizierten Proteaseformen handelt, die bei der Isolierung

ohne Anionenaustauschchromatographie nicht voneinander trennbar sind. Die von Braymer isolierte Exoprotease des gleichen Stammes (33) und die von Miyata gewonnene Protease aus S. piscatorium (92) (beide mit der Exoprotease identisch) wird allerdings von den Autoren als homogene, einzige Exoprotease des Mediums angegeben. In eigenen früheren Isolierungen der Protease I war ebenfalls ein zweiter sehr kleiner Proteasegipfel an DEAE-Cellulose eluiert worden (17). Durch Auftrag zu hoher Proteasekonzentrationen in der SDS-PAGE war die Protease II aber nicht erkannt worden. Die schlechte elektrophoretische Trennung der Proteasen und besonders die Arbeit mit logarithmischen Zellen sind vermutlich die Gründe, warum die Proteaseformen nicht auch in früheren Untersuchungen entdeckt wurden. Die Tatsache, daß die Exoprotease (I) in verschiedenen Ladungsformen (II, III) im Zellüberstand vorliegen kann, wirft die Frage auf, ob die 3 - 4 Exoproteasen, die von Hammel (20) und Grimont (47) aus S. marcescens-Hospitalstämmen aufgrund von Zymogrammen identifiziert wurden, nicht auch Varianten eines einzigen Proteins darstellen, zumal die von Hammel beschriebenen Proteasen einen einzigen Proteasegipfel in der Gelfiltration lieferten.

Das Auftauchen der Protease I, II und III in den verschiedenen Zellstadien der in TY-Medium gezüchteten Zellen war reproduzierbar. Nach radioaktiver Markierung wurde, ebenfalls wiederholt, eine neue mit Anti-Exoprotease-Serum fällbare Proteinkombination im Zellüberstand festgestellt: Protease I (51.000 Dalton) und Protein III (53.000 Dalton). Es stellt sich nun die Frage, ob Protein III der Protease III entspricht. Dies wurde anfänglich aus folgenden Gründen nicht angenommen: a) Die Kombination von Protease I und III war in TY-Medium (unmarkierte Zellen) nie vorgekommen. b) Die Protease III war immer nur in der späten Absterbephase (nie aber während der Sekretionsphase und nie in gleich hoher Konzentration wie die Protease I oder II) beobachtet worden. c) Das Auftauchen der Protease I- Protein III-Kombination war zuerst unter Cysteinmangelbedingungen entdeckt worden, so daß die Freisetzung einer Proform unter diesen deregulierten Bedingungen nicht auszuschließen war, zumal der pH im AS-GBM unter pH 8 liegt, so daß keine Protease II- oder III-Bildung zu erwarten war. d) Das Spaltproduktmuster (V8-Verdau) von Protease I und Protein III war vollkommen identisch. Das bei Protease II festgestellte (und für Protease III angenommene) höhermolekulare Spaltprodukt (nach SDS-PAGE) fehlte. Ein direkter Beweis der Identität beider Pro-

teine liegt nicht vor, dennoch wird aufgrund verschiedener Beobachtungen angenommen, daß das Protein III der Protease III entspricht: a) Beide Proteine haben die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit. b) Protein III taucht auch in Pulsmarkierungsversuchen in TY-Medium auf. c) Beide Proteine entstehen im Zellüberstand. Im TY-Medium konnte die Protein III-Entstehung über das Zwischenprodukt (Prot. II) beobachtet werden. d) Beide Proteine sind aktiv: Bei Protease III konnte dies über die Isolierung direkt, bei Protein III indirekt und aus der Tatsache, daß es aus Protease I entsteht, erkannt werden. e) Kochen des Protein I-Protein III-Gemisches in OPA-Anwesenheit führte zur Abnahme der Protease I-Bande und zur Zunahme der Protein III-Bande. f) Bei der in Abb. 44 angegebenen proteolytischen Spaltung im Gel ist bei Protein III neben dem Protease I-identischen Spaltprodukt auch die höhermolekulare Form zu erkennen, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß dieses ein normales Zwischenspaltprodukt ist. Allerdings konnte bei Protease I diese Form nach keiner Protease V8-Spaltung wiedergefunden werden.

Die Entstehung des Protein III im Zellüberstand ist in Abb. 29 deutlich zu erkennen. Allerdings konnte auch festgestellt werden, daß die Protease III auch nachträglich, d.h. während der Immunfällung oder der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE (nicht mehr nachvollziehbar) gebildet wird (Abb. 43). Die Annahme, daß auch die Protease III-Entstehung, wie dies für Protease II gezeigt wurde, nur durch Desaminierung erfolgt, müßte genauer überprüft werden. Es scheint hier noch ein anderer Faktor eine Rolle zu spielen, da sonst auch die Protease II nach radioaktiver Markierung häufiger zu finden sein müßte. Die Protease II verhielt sich aber wie nach obigen Erläuterungen zu erwarten war, d.h. keine Protease II-Bildung unterhalb pH 8 oder in hoher Konzentration während der Sekretionsphase. Die Protease III-Bildung ist nicht vollständig geklärt. Hier fehlt der direkte Beweis, daß nicht eventuell eine "echte" Modifizierung und nicht nur eine innermolekulare Umstrukturierung (durch Ladungserhöhung) der Protease I erfolgt. Außerdem müßte der von Miyata (92) und Lyerly (78) festgestellte Kohlehydrat-freie Charakter der Protease I überprüft werden, um sicher zu sein, daß nicht eventuell eine Demodifizierung die Ursache der Protease III-Bildung ist. Fettsäuregehalt konnte bei der Protease I (kein Einbau von ^{3}H-Glycerin) in einem "Pilotversuch"

zwar nicht festgestellt werden, aber auch dies müßte reproduziert werden, um eindeutige Aussagen zu machen. Das Protein III (bzw. Protease III) sollte aufgrund der gemachten Beobachtungen ebenfalls wie die Protease II nicht gemäß seiner molekularen Größe in der SDS-PAGE laufen. Hier gelten die gleichen Vermutungen für abnormales Laufverhalten wie sie oben für Protease II und III angegeben sind. Insgesamt muß davon ausgegangen werden, daß alle Proteaseformen, die ebenfalls alle mit Anti-Exoprotease-Serum aus dem Zellüberstand fällbar sind, einer einzigen Exoprotease entsprechen, die in verschiedenen (Ladungs-) Formen im Zellüberstand vorliegen kann und deshalb in der SDS-PAGE unterschiedliche Bandenpositionen einnimmt. Es ist auszuschließen, daß S. marc. ATCC 25419 mehrere Proteasen in das Medium ausscheidet.

Proteasesekretion unter normalen Wachstumsbedingungen

Die Tatsache, daß die "höhermolekularen" Proteasen des Zellüberstandes aus der Protease I im Medium oder während der Präparation entstehen, beinhaltet schon, daß die Protease I die erste und einzige Proteaseform ist, die von der Zelle in das Medium ausgeschieden wird. Dies konnte direkt im "pulse-chase"-Versuch mit 5 Sek. Puls gezeigt werden (Abb. 22). Das parallele Auftreten von Protease I und Protein III unter Cysteinmangelbedingungen schon ab 5 Sek. (bis 60 Min.) Pulsmarkierung (Abb. 26) kann auf Protein III-Bildung während der Präparation oder auf den "langsameren" Pulsstop zurückgeführt werden und spricht nicht gegen die obige Aussage.
Die schnelle Sekretion neugebildeter (radioaktiv markierter) Protease in das Medium bestärkt die Befunde, daß in keinem Zellstadium unter normalen Wachstumsbedingungen (TY-Medium) bzw. nach Induktion unter Cysteinmangelbedingungen Protein mit Anti-Protease-Serum aus Zellextrakten fällbar war (s. 3.6 und 3.7). Somit muß davon ausgegangen werden, daß ein Proteasevorläufer oder die Protease selbst weder permanent noch kurzzeitig intrazellulär in nachweisbarer Menge vorliegt. Die Sekretion der Protease scheint demnach nicht, wie z.B. die des α-Hämolysins von E. coli (129) oder die der Exoprotease von P. aeroginosa (64), über einen temporären zellulären Proteinpool zu erfolgen.
Die in der Absterbephase gemessene intrazelluläre Proteaseaktivität (17) konnte nicht mit Exoprotease-spezifischem Antiserum ausgefällt wer-

den, so daß es sich wohl um eine andere Protease handelt. Um einen Zusammenhang zur Exoprotease-Synthese auszuschließen, wäre es allerdings sinnvoll, diese Proteaseaktivität zu identifizieren, da die Möglichkeit besteht, daß Proteasemoleküle, die sich nach der Sekretionsphase in der Zelle anhäufen, in einer Konfiguration vorliegen, die nicht immunfällbar ist, was allerdings unwahrscheinlich ist, da sie enzymatisch aktiv sind. Wäre dies dennoch der Fall, dann könnten eventuell auf diesem Wege Komponenten, die am Export beteiligt sind, entdeckt werden.
Trotz kurzzeitiger Pulsmarkierung (5 Sek., Abb. 22) konnte keine zellgebundene Proteasevorstufe entdeckt werden. Dies spricht für einen raschen, an die Synthese gekoppelten Sekretionsmechanismus. Ähnliche Befunde wurden für verschiedene periplasmatische Proteine von E. coli gemacht, deren Proformen nach 10 Sek. Pulsmarkierung ebenfalls nicht nachweisbar waren (66, 111). Es wäre wohl voreilig, aus solchen Daten zu schließen, daß der Export der Protease durch 2 Membranen hindurch kotranslational erfolgt. Theoretisch ist dies aber durchaus denkbar. Da keine Vorstufe im Medium gefunden wurde, muß der "processing"-Schritt zellgebunden erfolgen. Dies könnte bei linearer Translokation der Polypeptidkette an der äußeren Membran stattfinden, zumal zumindest bei E. coli Signalpeptidaseaktivität auch in dieser Membran nachgewiesen wurde (95, 126). Wahrscheinlicher ist wohl aber eine Signalabspaltung in der inneren Membran, da dann auch der Durchtritt der nascenten Polypeptidkette als "loop", wie von Inouye vorgeschlagen (35), möglich wäre. In diesem Fall könnte eventuell eine zweite "Signalsequenz", wie von Blobel diskutiert (7), den Durchtritt durch die äußere Membran initiieren. Sekretionsstudien mit Protoplasten könnten hier Klarheit schaffen.

Akkumulation des zellgebundenen 52 K Proteins

Durch radioaktive Markierung der Zellen in Anwesenheit von Procain, PEA, TLCK, EDTA, NaN_3 und Rifampicin gelang der Nachweis eines zellgebundenen, mit Anti-Protease-Serum fällbaren Proteins, dessen Molekulargewicht, nach der SDS-PAGE, 52.000 Dalton beträgt und somit um 1.000 Dalton größer als das der (reifen) Protease I ist (Abb. 39 - 42). Die Akkumulation dieses Proteins mit Hilfe aller getesteten "Sekretionsinhibitoren" ist erstaunlich und könnte auf den Einsatz der für die Proteasesekretion, in Wachs-

tums- und Aktivitätsfreisetungs-Versuchen, ermittelten spezifischen Hemmstoffkonzentrationen zurückgeführt werden (s. 3.10.1). Neben der immunologischen Kreuzreaktion wurde die hohe Verwandtschaft zu den extrazellulären Proteasen anhand der identischen Spaltprodukte nach V8-Proteaseverdau belegt (Abb. 44). Die Zellständigkeit des 52 K Proteins kann nicht bezweifelt werden, da die zellgebundene Form meist in größerer Menge vorlag als die Proteasen des Zellüberstandes (Abb. 39, 40) bzw. in einigen Fällen nur aus den Zellextrakten Antigen fällbar war (Abb. 41). Da das 52 K Protein in gleicher Position wie die Protease II im SDS-Polyacrylamidgel läuft, ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß die intrazellulär angehäufte Proteaseform schon die gleiche Größe wie die reife, extrazelluläre Protease besitzt. Das könnte aus dem mit Protease I und Protein III identischen Peptidmuster nach V8-Protease-Spaltung geschlossen werden (Abb. 44). Folgende Befunde unterstützen die Annahme, daß es sich um eine höhermolekulare, d.h. Signalpeptid-haltige Proteasevorstufe handelt: a) Das tatsächliche Molekulargewicht des 52 K Proteins ist nicht bekannt, da abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE bei Protease-verwandten Proteinen nicht auszuschließen ist und nur ein Gelsystem benutzt wurde. In Zellextrakten war aber neben dem 52 K Protein nie Protein III entdeckt worden, was für "normales" Laufverhalten oder zumindest gegen eine Proteasekonfiguration, die in Protein III aufspaltet, spricht. Die Stabilität des zellgebundenen Proteins könnte auf einem Zusatzpeptid beruhen; allerdings wurden keine Untersuchungen zur nachträglichen Umwandlung des 52 K Proteins (z.B. Kochen in OPA) durchgeführt. b) Die Tatsache, daß aus Zellextrakten mehrfach neben dem 52 K Protein auch die Protein I-Bande auftrat, muß auf einen "processing"-Schritt zurückgeführt werden, da eine Umwandlung der höhermolekular erscheinenden extrazellulären Proteaseformen in die Protease I nie beobachtet worden war. c) Die meisten der hier benutzten "Sekretionsinhibitoren" führten bei einer Vielzahl von sekretorischen Proteinen (*E. coli*) zur Anreicherung der Proformen durch Inhibition der Signalpeptidabspaltung. d) Der direkte Nachweis der Vorläufer-Produkt-Beziehung gelang nach vorheriger Akkumulation des 52 K Proteins durch Rifampicin (Abb. 42) und bei verzögerter Sekretion (Abb. 48). Das 52 K Protein ist wahrscheinlich die einzige Proteasevorstufe, da es durch alle eingesetzten Inhibitoren, die teil-

weise in ihrem Wirkungsmechanismus- bzw. ort unterschiedlich sind, angehäuft wurde. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß noch nicht entdeckte Zwischenformen existieren. Die Protease I-Bande könnte eine solche, wohl inaktive, Form sein. Sicherlich wird dieses Protein aber nicht primär durch die eingesetzten Hemmstoffe angereichert, da es sonst auch alleine oder zumindest reproduzierbar in Zellextrakten nachweisbar sein sollte. Es kann angenommen werden, daß das 52 K Protein die erste, d.h. native Proteaseproform ist, was aus folgenden Befunden abzuleiten ist: a) Die Anreicherung erfolgte mit NaN_3, PEA und Procain, deren Wirkung auf die innere Membran einen frühen Sekretionsschritt inhibieren sollte. b) Zumindest nach TLCK-Gabe konnte das 52 K Protein in der inneren Membran (Triton X-100-lösliche Fraktion) nachgewiesen werden. c) Das 52 K Protein war das erste aus Zellextrakten fällbare Protein bei verzögerter Sekretion.

Proteasesekretion unter Cysteinmangelbedingungen

Die Proteasesynthese war im Aminosäure-haltigen Glycerolbasalmedium im Vergleich zum TY-Medium stark vermindert (<10 %), was auf eine schlechtere Induktion bzw. teilweise Endproduktrepression zurückgeführt wird. Unter Cysteinmangelbedingungen wurde, trotz Wachstumsstillstand, bis zu 10 Std. lang Protease in das Medium ausgeschieden (Abb. 23), so daß die Exoprotease-Synthese keiner stringenten Kontrolle zu unterliegen scheint, was auch bei verschiedenen Exoenzymen von S. marc. SM 6 festgestellt wurde (199). Aus Markierungsexperimenten (s. 3.7.2) ging hervor, daß der Aminosäurehunger keine spezifische Proteinsynthese zur Folge hatte, wie dies erwartet worden war (die Protease enthält kein Cystein) und z.B. für das Lipoprotein (154) oder die Tryptophansynthetase A von E. coli beschrieben wird (37). Die Synthese wohl aller Zellproteine lief zumindest so stark weiter, daß der Zellmetabolismus aufrechterhalten blieb. Hieraus ist ein hoher Proteinturnover abzuleiten, zumal während Chloramphenicol-Gaben Proteinabbau beobachtet wurde (s. 3.10.4). Die Proteasefreisetzung in das Medium erfolgte, wie im TY-Medium, sehr rasch (innerhalb 5 Sek., Abb. 27) und intrazellulär konnte kein Antigen nachgewiesen werden (Abb. 24).
Die anfänglich beobachtete Proteasesynthese bzw. -sekretion unter Cysteinmangelbedingungen war nicht jederzeit reproduzierbar. In einigen

späteren Versuchen wurde bis zu 15 Min. keine Protease in das Medium ausgeschieden und das 52 K Protein häufte sich in der Zelle an (Abb. 46 und 47). Die verzögerte Sekretion und gleichzeitige Akkumulation zellgebundener Vorstufe könnte verschiedene Ursachen haben: 1) Wie unter Cysteinmangelbedingungen zu erwarten wäre, sollte der Mangel an Cystein-haltigen Proteinen der Exportmaschinerie eine Sekretionsverzögerung zur Folge haben. Dieser Effekt wurde bei der K88-Fimbrien-Biosynthese einer E. coli-Mutante festgestellt (96). 2) Bei stärkerer Repression könnte eine verminderte Synthese als limitierender Schritt den gleichen Effekt haben. 3) Da Aminosäuremangel herrscht und eventuelle stringente Kontrolle vorliegt, könnten Pausen während der Translation, wie bei der Synthese des Maltose-Bindeproteins von E. coli (120) und des Colicin A von C. freundii (134), verantwortlich sein. Als Hinweis hierzu könnte das im "pulse-chase"-Versuch entdeckte Proteingemisch unterhalb der 52 K-Bande gewertet werden. 4) Es scheinen Bedingungen vorzuliegen, die kotranslationales "processing" verhindern, so daß posttranslationale Signalabspaltung erfolgt. Dies könnte, wie auch in der Literatur beschrieben (43, 61), langsamer sein. Josefsson und Randall konnten zeigen, daß bei den meisten untersuchten sekretorischen Proteinen von E. coli ko- und posttranslationale Signalabspaltung erfolgt (66). Der Nachweis des zellgebundenen 52 K Proteins bei verzögerter Sekretion, also ohne Einsatz von "Sekretionsinhibitoren", zeigt, daß auch bei der Exoprotease beide Modi möglich sind. (Auch aus der zumindest teilweisen Umsetzung des 52 K Proteins in die Protease I nach Rifampicin-Anreicherung muß posttranslationales "processing" geschlossen werden). Allerdings kann aufgrund der Befunde unter normalen Wachstumsbedingungen davon ausgegangen werden, daß die Synthese-gekoppelte Signalpeptidabspaltung der normale Sekretionsschritt ist. Markierungsexperimente bei verzögerter Sekretion belegten, daß das 52 K Protein das erste mit Anit-Exoprotease-Serum fällbare Syntheseprodukt ist, aus dem die Protease(n) des Zellüberstandes quantitativ hervorgehen (Abb. 46 - 48). Somit kann davon ausgegangen werden, daß das 52 K Protein eine echte Vorstufe ist und kein biosxnthetisches oder während der Präparation entstandenes Nebenprodukt.

Die Proteasesekretion unter diesen Bedingungen müßte noch eingehender studiert werden. Die Bestimmung der Lokalisation des 52 K Proteins und der Vergleich von Membranmustern bei normaler und verzögerter Sekretion könnte wertvolle Aufschlüsse über den Exportmechanismus und daran beteiligter Komponenten liefern. Das unterschiedliche Verhalten der Cystein-auxotrophen Zellen unter Cysteinmangel ist unverstanden. Ähnliche nicht reproduzierbare Befunde wurden in früheren Untersuchungen bei der Leucininduktion der Exoprotease festgestellt (125). Vermutlich müssen die Gründe hierfür auf regulatorischer Ebene gesucht werden. Da bei verzögerter Sekretion nicht viel mehr Protease in das Medium freigesetzt wird als im Aminosäure-freiem GBM, also ohne Induktor, wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob unter nicht induzierenden Bedingungen (beim Wildtyp, ohne Aminosäurehunger) ebenfalls zellgebundenes 52 K Protein vorliegt. Wäre dies der Fall, dann wäre dies ein ideales System (da reproduzierbar), um den Weg des Vorläufers durch die verschiedenen Zellkompartimente zu verfolgen.

Hypothetische Sekretionsschritte

Die Exoprotease-Synthese ist Rifampicin-unempfindlich, da noch mindestens 30 Min. nach Hemmstoffzugabe Aktivitätsanstieg im Zellüberstand meßbar ist (Abb. 36). Hirashima konnte zeigen, daß die Synthese mehrerer Membranproteine bei E. coli weniger von dem Transciptionsinhibitor beeinflußt wird als die der cytoplasmatischen Proteine (55) und Randall wies nach, daß die membrangebundenen nicht aber die freien Polysomen die stabilere mRNA enthalten (121), so daß angenommen werden kann, daß die Exoprotease-Synthese an membrangebundenen Ribosomen erfolgt. Die für die Protease bestimmte mRNA-Halbwertszeit von ca. 15 Min. ist im Vergleich zu den von Hirashima für die E. coli-Membranproteine mit 5,5 - 11,5 Min. und der des S. marc.-Lipoproteins (exprimiert in E. coli) mit 7 Min. (76) relativ hoch. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß ein mRNA-pool vorliegt, wie dies für die Exoprotease von B. amyloliquefaciens gezeigt wurde (105) und für einige andere extrazelluläre Enzyme angenommen wird (128, 131). Die in einigen Pulsmarkierungsversuchen beobachtete Anhäufung des 52 K Proteins, die zumindest teilweise reversibel war (Abb. 39 und 42), kann wohl nicht auf direkten Eingriff des Hemmstoffes

auf den Sekretionsmechanismus zurückgeführt werden. Es könnte sein, daß zur Sekretion benötigte Proteine nicht mehr nachlieferbar sind, oder daß die Synthese verschiedener sekretorischer Proteine erhöht ist, so daß es zu Engpässen an speziellen (angenommenen) Exportstellen kommt. Dies könnte auch den noch relativ hohen ^{14}C-Aminosäure-Einbau (44 %) in Proteine, trotz Rifampicinanwesenheit (1 Std.), erklären (Tab. 6). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu testen, ab wann nach Hemmstoffzugabe die intrazelluläre Anhäufung erfolgt und ob bzw. welche Membranproteinmuster-Veränderung gleichzeitig auftritt. Die nach Rifampicinzugabe freigesetzte Exoprotease kann nicht von einem vorgebildeten intrazellulären Proteasepool herrühren, da Neusynthese (Einbau der ^{14}C-Aminosäuren) nach Rifampicinzugabe (mit bis zu 15 Min. Vorinkubation) erfolgte (Abb. 37).

Die erhöhte Proteasesekretion (pro Zelle) in Anwesenheit von NaN_3 (bis zu 7,5 mM) kann ebenfalls nicht auf vorgebildete Protease zurückgeführt werden, da Zellyse keine Aktivität freisetzte (Abb. 38) und markiertes Protein ausgeschieden wurde (Abb. 39, 40, 42). Da das Wachstum durch NaN_3 stark betroffen ist, könnte ein Zusammenhang zwischen der stabilen Protease-mRNA und der gleichbleibenden Syntheserate bestehen. Auch könnte benötigte restliche Energie bevorzugt der Proteasesekretion zur Verfügung stehen, was bei einer membrangebundenen Synthese denkbar ist.

Nach den Wachstums- und Aktivitätskurven (Abb. 38) könnte ein Energieunabhängiger Proteaseexport angenommen werden. Dagegen spricht allerdings die teilweise beobachtete Akkumulation des zellgebundenen 52 K Proteins, besonders unter Cysteinmangelbedingungen (Abb. 40). Auch bei vielen sekretorischen Proteinen von E. coli wurde die Signalpeptidspaltung durch Entkoppler verhindert (27, 29, 41, 113, 115), so daß auch bei der Exoproteasefreisetzung das Membranpotential eine Rolle spielen sollte. Um genauere Aussagen über die Energieabhängigkeit der Proteasetranslokation zu erhalten, müßten die Ergebnisse mit anderen Entkopplern (z.B. CCCP[1] oder DNP[2]) und mit Arsenat (Hemmung der ATP-Bildung) überprüft werden, direkte Inhibition der Signalpeptidase durch NaN_3, wie bei der M13-Hüllprotein-Signalase gefunden (28), ausgeschlossen werden und Bedingungen gefunden werden, die keine Zellyse verursachen.

1: Carbonylcyanid m-Chlorphenylhydrazon

2: Dinitrophenol

Das 52 K Protein müßte nach Akkumulation durch NaN_3-Gabe in der inneren Membran vorliegen, so daß auch der "processing"-Schritt in dieser Membran stattfinden sollte. Diese Vermutung wird durch den Nachweis zellgebundener Vorstufe durch Procain und PEA bestärkt, da bei E. coli die meisten Proformen nach Anästhetikabehandlung in der inneren Membran wiedergefunden wurden (48, 75, 111, 113). Durch PEA wird die Protease-sekretion und besonders das Zellwachstum stärker beeinträchtigt als durch Procain (Abb. 31 und 32), was auch bei E. coli festgestellt wurde (112). Pages und Lazdunski zeigten, daß beide Hemmstoffe die Genexpression zweier periplasmatischer Proteine beeinflußt (112). Es ist möglich, daß auch bei der Protease zumindest PEA auf Transcriptionsebene eingreift, da die gesamte fällbare Antigenmenge nach PEA-Gabe (Abb. 39, 40, 42) und der ^{14}C-Einbau in Gesamtprotein (Tab. 6) geringer als nach Procain-Gabe war.

Die Wirkung von Procain könnte auch auf direkter Inhibition der Signalpeptidase beruhen, da Gayda Procain als kompetitiven Trypsininhibitor charakterisierte (42) und durch Einsatz von TLCK das 52 K Protein besonders gut (in TY-Medium) intrazellulär angehäuft wurde (Abb. 42). Es muß angenommen werden, daß diese Akkumulation auf Hemmung eines proteolytischen Prozesses in der inneren Membran beruht, da das 52 K Protein in dieser nachweisbar war (Abb. 45).

Da der "processing"-Schritt durch TLCK hemmbar ist, ist es unwahrscheinlich, daß dieser Schritt auch durch EDTA, das ab 1 mM Sekretionsstop bewirkte, inhibiert wird. Die Hemmung eines 2. proteolytischen Prozesses muß ebenfalls ausgeschlossen werden, da zumindest in einigen Versuchen das 52 K Protein nach EDTA-Gabe vorlag (Abb. 39, 41). Somit könnte die Sekretionsinhibition auf die Wirkung von EDTA auf die äußere Membran zurückzuführen sein. Leive konnte zeigen, daß bei verschiedenen E. coli- und Salmonella-Stämmen durch EDTA (0,1 - 10 mM) bis zu 60 % des LPS aus der Membran herausgelöst wird, wobei ca. je 5 % des abgelösten Materials auch Proteine und Phospholipid darstellt (77). Bei S. marcescens war nur das 36 K Protein in das Medium freigesetzt worden, die Membranproteinsynthese an sich war aber nicht betroffen, da keine erkennbaren Änderungen im Proteinmuster, zumindest bei 1 mM EDTA, festzustellen war (Abb. 35). Es wird deshalb vermutet, daß die Sekretionshemmung auf das Fehlen von Lipopolysaccharid bzw. eine dadurch veränderte Membranstruktur zu-

rückzuführen ist. Wie kann aber, wenn der EDTA-Effekt die äußere Membran betrifft, die Akkumulation des 52 K Proteins, dessen Zusatzpeptid nach obigen Überlegungen in der inneren Membran abgespalten werden sollte, erklärt werden? Es könnte sein, daß der "processing"-Schritt doch erst, wie schon anfänglich in Erwägung gezogen, außerhalb der Cytoplasmamembran stattfindet oder an deren Außenseite unter Einwirkung von Komponenten der äußeren Membran. Auch besteht die Möglichkeit, daß spezielle Adhäsionsstellen zwischen äußerer und innerer Membran eine Rolle spielen, wie dies beim Matrix-Protein von S. typhimurium gezeigt wurde (127). In beiden Fällen könnte der Verlust von LPS die für den Transfer von der inneren zur äußeren Membran (angenommenen) nötigen Interaktionen (direkt oder indirekt) inhibieren, so daß der gleiche "processing"-Schritt, der durch alle obengenannten Hemmstoffe inhibiert wurde, auch durch EDTA blockiert sein könnte. Die Beteiligung von LPS am "processing"- oder Translokationsschritt wird auch für das OmpA-Protein der äußeren Membran von E. coli (34) und die extrazelluläre alkalische Phosphatase von P. aeruginosa (5) diskutiert. Es ist auch nicht auszuschließen, daß zweiwertige Ionen direkt am Export beteiligt sind, wie dies z.B. für eine Exopolymerase von P. lemoignei (131) oder einer Exophospholipase von P. aeruginosa (130) angenommen wird. Da EDTA nicht immer zur Anhäufung zellgebundenen Antigens führte, ist auch eine Hemmung der Proteasesynthese nicht auszuschließen. Dies müßte dann sehr spezifisch sein, da der Gesamtmetabolismus (kein Effekt auf das Wachstum, 85 % ^{14}C-Aminosäure-Einbau in Protein) nicht wesentlich betroffen war und könnte dann das Auftauchen des 52 K Proteins nicht erklären.

Die Aktivierung der Protease ist unklar. Intrazellulär konnte kein Anstieg der proteolytischen Aktivität nach Hemmstoffzugabe festgestellt werden (Tab. 5), so daß das 52 K Protein höchstwahrscheinlich inaktiv ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die intrazellulär angehäufte Proteinmenge zum Nachweis der proteolytischen Aktivität zu gering war. Dies müßte mit einem empfindlichen Enzymtest überprüft werden. Da das 52 K Protein auch nach EDTA-Behandlung vorliegt, kann über den Effekt von EDTA auf den Aktivierungsschritt keine eindeutige Aussage gemacht werden. Auch Versuche mit OPA (nicht gezeigt) führten nicht weiter, da der Einsatz von Protease-hemmenden Konzentrationen (10 mM) Zellyse verursachte. Die nach EDTA-Einfluß gemessene Aktivität in der

Gesamtkultur, die auf an der Zelloberfläche gebundene Protease zurückzuführen ist, deutet zumindest auf einen zellgebundenen Aktivierungsschritt hin, vorausgesetzt es handelt sich um Exoproteaseaktivität, was noch zu beweisen wäre. Es könnte sein, daß die Aktivierung in oder an der Außenseite der äußeren Membran erfolgt. In Anwesenheit von EDTA könnte eventuell die Aktivierung (schon processierten 52 K Proteins) noch erfolgen, nicht aber die Freisetzung in das Medium, wenn z.B. durch die veränderte Membranstruktur die Affinität zu am Export beteiligten äußeren Membrankomponenten beeinträchtigt ist oder diese nicht mehr zugänglich sind.
Zusammenfassend könnte man folgende Schritte der Proteasesynthese und -sekretion postulieren: a) Synthese an membrangebundenen Ribosomen. b) Durchtritt durch die innere Membran mit Hilfe des Signalpeptids und wahrscheinlich des Membranpotentials. c) Ko- oder posttranslationale Signalpeptidabspaltung an der inneren Membran oder innerhalb von Adhäsionsstellen unter Beteiligung von äußeren Membrankomponenten. d) Aktivierung des noch zellgebundenen Proteins und Freisetzung in das Medium ebenfalls unter Mitwirkung von Membrankomponenten.
Obwohl dieser, an die Signalhypothese angelehnte hypothetische Sekretionsmechanismus die erhaltenen Ergebnisse am besten erklärt, sind auch andere oder zusätzliche Translokationsmöglichkeiten denkbar. So ist im Hinblick auf die Protease I-Umwandlungsfähigkeit (in Protease II und III) und das identische elektrophoretische Laufverhalten des 52 K Proteins mit der Protease II nicht auszuschließen, daß kein bzw. ein internes Signalpeptid vorliegt. Ein proteolytischer Reifungsprozeß wird zwar angenommen, muß aber nicht gefordert werden, wenn alle eingesetzten "Sekretionsinhibitoren" (mit Ausnahme von Rifampicin) nicht indirekt (über Signalasehemmung), sondern direkt aufgrund der von ihnen geänderten Membranstruktur oder -fluidität die Anhäufung des 52 K Proteins bewirken. Auch ist es möglich, daß Modifizierungsschritte, wie für einige sekretorische Proteine bei E. coli gezeigt (58, 87, 116), oder angenommen (96), oder ein Proteaseinaktivator eine Rolle spielt. Derartige Vorgänge könnten auch ohne Signalpeptid das Laufverhalten des 52 K Proteins erklären.

Viele Fragen zur Proteasesekretion sind noch offen. Um den angenommenen Signalpeptidgehalt des 52 K Proteins zu beweisen, müßte dieses Protein nach Anreicherung isoliert und Aminosäuresequenzanalysen durchgeführt werden. Günstiger wäre es sicherlich, genetische Stu-

dien einzuleiten. Durch Bestimmung der DNA-Sequenz könnte ein N-terminales (oder internes) Signalpeptid identifiziert werden. Auch wäre es interessant festzustellen, ob für die Exoproteaseproduktion ein eigenes Gencluster, wie es für das Hämolysin (45, 102) und die K88 ab Fimbrien (95, 96) von E. coli gezeigt wurde, vorliegt. Für die Translokation bis zur äußeren Membran könnte eine "allgemeine" Exportmaschinerie benutzt werden, für den Durchtritt durch die äußere Membran wären aber spezifische Komponenten zu fordern. Das Lipoprotein (76) und OmpA-Protein (25) aus S. marcescens konnte in E. coli exprimiert und korrekt bis in die äußere Membran transportiert werden. Die Expression der Exoprotease in E. coli könnte somit wertvolle Aufschlüsse über die Spezifität der Proteasesekretionsschritte liefern. Auch könnte mit Hilfe gentechnologischer Methoden die Regulation der Exoprotease studiert werden, die wie für viele andere Exoenzyme noch weitgehend unverstanden ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Neben der Protease I (51.000 D), die aktiv, bevorzugt gegen Ende des logarithmischen Wachstums ausgeschieden wird, konnte ab der stationären Phase die Protease II (52.000 D) mit Anti-Exoprotease-Serum aus TY-Zellüberstand ausgefällt werden. Während der Absterbephase war die Zunahme der Protease II-Bande und das Auftauchen der ebenfalls immunfällbaren Protease III (53.000 D) zu beobachten. Durch Inkubationsexperimente konnte gezeigt werden, daß die höhermolekular erscheinenden Proteaseformen keine durch Zellyse freigesetzte Proformen sind, sondern im Zellüberstand, aufgrund der Alkalisierung des Mediums, vermutlich durch Desaminierung aus der Protease I hervorgehen. Das Laufverhalten der Protease II und III in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese entspricht somit nicht der tatsächlichen Molekulargröße, sondern spiegelt wahrscheinlich die Ladungsunterschiede wieder. Teilsequenzanalysen der über DEAE-Cellulose-Chromatographie rein isolierten Protease I und II bestätigten die obigen Befunde, da bei beiden Proteinen ein identischer N-Terminus (keine Signalsequenz bei Protease II) und C-Terminus vorlag. Unter normalen Wachstumsbedingungen konnte in keinem Zellstadium eine zellgebundene Proteaseform nachgewiesen werden. Somit existiert kein vorgebildeter intrazellulärer Proteasepool, sondern die Freisetzung in das Medium erfolgt sehr rasch (innerhalb von 5 Sek.) und ist wahrscheinlich an die Synthese gekoppelt. Diese ist Temperatur-abhängig und Rifampicin-unempfindlich. Mit Hilfe verschiedener "Sekretionsinhibitoren" (Procain, Phenäthylalkohol, Natriumazid, TLCK, Rifampicin) konnte eine zellgebundene, scheinbar inaktive Proteasevorstufe angereichert werden. Dieses 52 K Protein war zumindest nach Akkumulation durch Rifampicin teilweise in die Protease I "chase"-bar und konnte in TLCK behandelten Zellen in der inneren Membran und der löslichen Fraktion nachgewiesen werden, was als Hinweis auf einen in oder an der Cytoplasmamembran stattfindenen processing-Schritt gewertet wird. Puls- und "pulse-chase"-Experimente bei verzögerter Sekretion (unter nicht induzierenden Cysteinmangelbedingungen) bestätigten, daß das 52 K Protein das erste immunfällbare Syntheseprodukt ist, aus dem die in das Medium freigesetzte Protease I (und ihre verschiedenen Ladungsformen) hervorgeht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ambler, R.P. (1977). In: Methods in Enzymology XXV, pp. 143-154; 262-272. C.M.W. Hirs and Serge N. Timasheft (eds.).

2. Bassford, P., Silhavy, T., Beckwith, J. (1979). J. Bacteriol. 139, 19-31.

3a. Bayer, M.E. (1968). J. Gen. Microbiol. 53, 395-404.

3. Bayer, M.E., Thurow, M. (1977). J. Bacteriol. 130, 911-936.

4. Beyreuther, K., Bieseler, B., Ehring, R., Müller-Hill, B. (1982). In: Methods in Protein Sequence Analyses. pp. 139-148. The Humana Press.

5. Bhatti, A.R., Ingram, J.M. (1982). FEMS Microb. Lett. 13, 353-356.

6. Blobel, G., Dobberstein, B. (1975). J. Cell Biol. 67, 852-862.

7. Blobel, G. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1496-1500.

8. Boethling, R.S. (1975). J. Bacteriol. 123, 954-961.

9. Bohne, L., Winkler, U. (1979). Arch. Microbiol. 121, 181-186.

10. Brandt, C.J., Catley, B.J., Awad, W.M. Jr. (1976). J. Bacteriol. 125, 501-508.

11. Braun, V. Persönliche Mitteilung.

12. Braun, V. (1975). Biochim. Biophys. Acta 415, 335-377.

13. Braun, V. (1977). Naturwissenschaften 64, 126-132.

14. Braun, V., Hantke, K. (1981). Review Bacterial Cell Surface Receptors. In: Organization of Prokaryotic Cell Membranes. Vol. II, CRS Press, Inc. Florida.

15. Braun, V., Hantke, K. (1982). In: Membranes and Transport, pp. 107-115. A. Martonosi (ed.). New York, Plenum.

16. Braun, V., Rehn, K., Wolff, H. (1970). Biochem. 9, 5041-5049.

17. Braun, V., Schmitz, G. (1980). Arch. Microbiol. 124, 55-61.

18. Brazel, C. (1980). Diplomarbeit. Universität Tübingen.

19. Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag, I., Henning, U. (1980). Mol. gen. Genet. 179, 13-20.

20. Bromke, B.J., Hammel, J.M. (1978). Can. J. Microbiol. 25, 47-52.

21. Cancedda, R., Schlesinger, M. (1974). J. Bacteriol. 117, 290-301.

22. Casadaban, M. (1976). J. Mol. Biol. 104, 541-555.

23. Chang, C.N., Nielsen, J.B.K., Izui, K., Blobel, G., Lampen, J.O. (1982). J. Biol. Chem. 257, 4340-4344.

24. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K. (1977). J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.

25. Cole, S.T., Sonntag, I., Henning, U. (1982). J. Bacteriol. 149, 145-150.

26. Crowlesmith, I., Gamon, K., Henning, U. (1981). Eur. J. Biochem. 113, 375-380.

27. Daniels, C.J., Bole, D.G., Quay, S.C., Oxender, D.L. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5396-5400.

28. Date, T., Goodman, J.M., Wickner, W. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4669-4673.

29. Date, Z., Zwizinski, C., Ludmerer, S., Wickner, W. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 827-831.

30. Davis, A., Moore, J.B., Parker, D.S., Taninchi, H. (1977). J. Biol. Chem. 252, 6544-6553.

31. Davis, B.D., Tai, P.C. (1980). Nature 283, 433-438.

32. Decad, G., Nikaido, M. (1976). J. Bacteriol. 128, 325-336.

33. Decedue, C.J., Broussard, E.A., Larson, A.D., Braymer, H.D. (1979). Biochim. Biophys. Acta 569, 293-301.

34. DiRienzo, J.M., Inouye, M. (1979). Cell 17, 155-161.

35. DiRienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M. (1978). Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532.

36. Drapeau, G. (1978). J. Bacteriol. 136, 607-613.

37. Edlin, G., Stent, G.S., Baker, R.F., Yanosfsky, C. (1968). J. Mol. Biol. 37, 257-268.

38. Emr, S.D., Hall, M.N., Silhavy, T.J. (1980). J. Cell Biol. 86, 701-711.

39. Emr, S.D., Hanley-Way, S., Silhavy, T.J. (1981). Cell 23, 79-88.

40. Emr, S.D., Hedgpeth, J., Clement, J.M., Silhavy, T.H., Hofnung, M. (1980). Nature 285, 82-85.

41. Enequist, H.G., Hirst, T.R., Hardy, S.J.S., Harayama, S., Randall, L.L. (1981). Eur. J. Biochem. 116, 227-233.

42. Gayda, R.C., Henderson, G.W., Markovitz, A. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2138-2142.

43. Garwin, J.L., Beckwith, J. (1982). J. Bacteriol. 149, 789-792.

44. Glenn, A.R. (1976). Ann. Rev. Microbiol. 30, 41-62.

45. Goebel, W., Hedgpeth, J. (1982). J. Bacteriol. 151, 1290-1298.

46. Goodman, J.M., Watts, C., Wickner, W. (1981). Cell 24, 437-441.

47. Grimont, P.A.D., Grimont, F. (1978). Current Microbiol. 1, 15-18.

48. Halegua, S., Inouye, M. (1979). J. Mol. Biol. 130, 39-61.

49. Hall, M.N., Silhavy, T.J. (1981). Ann. Rev. Genet. 15, 91-142.

50. Hantke, K. (1973). Dissertation. Universität Tübingen.

51. Heller, K.B. (1979). J. Bacteriol. 137, 670-672.

52. Heller, K.B. (1979). J. Bacteriol. 140, 1120-1122.

53. Herrero, E., Jackson, M., Bassford, P.J., Sinden, D., Holland, I.B. (1982). J. Bacteriol. 152, 133-139.

54. Hirashima, A., Inouye, M. (1973). Nature 242, 405-407.

55. Hirashima, A., Childs, G., Inouye, M. (1973). J. Mol. Biol. 79, 373-389.

56. Hirs, C.H.W. (1956). J. Biol. chem. 219, 611-621.

57. Howard, S.P., Buckley, J.T. (1983). J. Bacteriol. 154, 413-418.

58. Hussain, M., Ichihara, S., Mizushima, S. (1982). J. Biol. Chem. 257, 5177-5182.

59. Ichihara, S., Hussain, M., Mizushima, S. (1981). J. Biol. Chem. 256, 3125-3129.

61. Ito, K., Bassford, P.J., Beckwith, J. (1981). Cell 24, 707-717.

62. Ito, K., Beckwith, J.R. (1981). Cell 25, 143-150.

63. Izui, K., Nielsen, I.B.K., Caulfield, M.P., Lampen, I.O. (1980). Biochem. 19, 1882-1886.

64. Jensen, S.E., Fecyez, I.T., Stemke, G.W., Campbell, I.N. (1980). Can. J. Microbiol. 26, 87-93.

65. Jakes, K.S., Model, P. (1979). J. Bacteriol. 138, 770-778.

66. Josefsson, L.G., Randall, L.L. (1981). Cell 25, 151-157.

67. Josefsson, L.G., Randall, L.L. 61981). J. Biol. Chem. 256, 2504-2507.

68. Kennedy, E.P. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1092-1095.

69. Koshland, D., Botstein, D. (1982). Cell 30, 893-902.

70. Koshland, D., Sauer, R.T., Botstein, D. (1982). Cell 30, 903-914.

71. Kreil, G. (1981). Ann. Rev. Biochem. 50, 317-348.

72. Lai, J.-S., Sarvas, M., Brammar, W.J., Neugebauer, K. Wu, H.C. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3506-3510.

73. Lampen, J.O., Nielsen, J.B.K. (1982). J. Bacteriol. 152, 315-322.

74. Law, B.A. (1980). Transport and Utilization of Proteins by Bacteria. In: Microorganisms and Nitragen Sources, pp. J.W. Pyne (ed.). John Wiley and Sons Ltd.

75. Lazdunksi, C., Baty, D., Pages, J.M. (1979). Eur. J. Biochem. 96, 49-57.

76. Lee, N.L., Nakamura, K., Inouye, M. (1981). J. Bacteriol. 146, 861-866.

77. Leive, L., Shovlin, V.K., Mergenhagen, S.E. (1968). J. Biol. Chem. 243, 6384-6391.

78. Lyerly, D., Kreger, A. (1979). Infect. Immun. 24, 411-421.

79. Lin, J.J. C., Kanazawa, H., Ozols, J., Wu, H.C. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4891-4895.

80. Lingappa, V.R., Shields. D., Woo, S.L.C., Blobel, G. (1978). J. Cell Biol. 79, 567-572.

81. Liu, T.Y.L., Neumann, N.P., Elliott, S.D., Moore, S., Stein,. W.H. (1963). J. Biol. Chem. 238, 251-256.

82. Loriya, Z.K., Bryukner, B., Egerov, N.S. (1977). Mikrobiologiya 46, 440-446.

83. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265-275.

84. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alpen, L. (1975). FEBS Lett. 58, 254-258.

85. Lugtenberg, B., van Alpen, L. (1983). Biochem. Biophys. Acta 737, 51-115.

86. Mäntsälä, P., Zalkin, H. (1979). J. Biol. Chem. 254, 8540-8547.

87. MacGregor, C.H., McElhaney, G.E. (1981). J. Bacteriol. 148, 551-558.

88. McLaughlin, R.E., Keller, J.C. (1964). Boheman. Pathol. 6, 481-485.

89. Meyer, D.I., Krause, E., Dobberstein, B. (1982). Nature 297, 647-650.

90. Michaelis, S., Beckwith, J. (1982). Ann. Rev. Microbiol. 36, 435-468.

91. Milstein, C., Brownlee, G., Harrison, T. Mathews, M. (1972). Nature New. Biol. 239, 117-120.

92. Miyata, K., Maejima, K., Tomoda, K., Isono, M. (1970). Agr. Biol. Chem. 34, 310-318.

93. Miyata, K., Tomoda, K., Isono, M. (1970). Agr. Biol. Chem. 34, 1457-1462.

94. Miyata, K., Tomoda, K., Isono, M. (1971). Agr. Biol. Chem. 35, 460-467.

95. Mooi, F.R., Harms, N., Bakker, D., DeGraaf, F.K. (1981). Infect. Immun. 32, 1155-1163.

96. Mooi, F.R., Wijfjes, A., DeGraaf, F.K. (1983). J. Bacteriol. 154, 41-49.

97. Mühlradt, P., Menzel, J., Golecki, J., Speth, V. (1973). Eur. J. Biochem. 35, 471-481.

98. Nielsen, J.B.K., Caulfield, M.P., Lampen, J.O. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3511-3515.

99. Nielsen, J.B.K., Lampen, J.O. (1982). J. Biol. Chem. 257, 4490-4495.

100. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y. (1983). J. Bacteriol. 153, 241-254.

101. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., Foulds, J. (1983). J. Bacteriol. 153, 232-240.

102. Noegel, A., Rdest, U., Goebel, W. (1981). J. Bacteriol. 145, 233-247.

103. Noel, D., Nikaido, K., Ferro-Luzzi Ames, G. (1979). Biochemistry 18, 4159-4165.

104. Nossal, N.G., Heppel, L.A. (1966). J. Biol. Chem. 241, 3055-3062.

105. O'Connor, R., Elliott, W.H., May, B.K. (1978). J. Bacteriol. 136, 24-34.

106. Osborn, M., Gander, J., Parisi, E., Corson, J. (1972). J. Biol. Chem. 247, 3962-3972.

107. Osborn, M.J., Wy, H.C.P. (1980). Ann. Rev. Microbiol. 34, 369-422.

108. Oliver, D.B., Beckwith, J. (1981). Cell 25, 765-772.

109. Oliver, D.B., Beckwith, J. (1982). Cell 30, 311-319.

110. Oliver, D.B., Beckwith, J. (1982). J. Bacteriol. 150, 686-691.

111. Pages, J.M., Lazdunski, C. (1981). FEMS Microbiol. Lett. 12, 65-69.

112. Pages, J.M., Lazdunski, C. (1982). FEMS Microbiol. Lett. 15, 153-157.

113. Pages, J.M., Lazdunski, C. (1982). Eur. J. Biochem. 124, 561-566.

114. Palade, G.E. (1955). J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 59-68.

115. Palva, E.T., Hirst, T.R., Hardy, S.J.S., Halmgren, J., Randall, L. (1981). J. Bacteriol. 146, 325-330.

116. Pollitt, S., Zalkin, H. (1983). J. Bacteriol. 153, 27-32.

117. Pollok, M.R. (1962). In: The Bacteria, pp. 121-178. I.C. Gunsalus, R.Y. Stanier (eds.). London, New York, Academic Press.

118. Prestidge, L., Gage, V., Spizizen, J. (1968). J. Bacteriol. 107, 815-823.

119. Pugsley, A., Rosenbusch, J.B. (1981). J. Bacteriol. 147, 186-192.

120. Randall, L.L., Josefsson, L.G., Hardy, S.J.S. (1980). Eur. J. Biochem. 107, 375-379.

121. Randall, L.L., Hardy, J.S. (1977). Eur. J. Biochem. 75, 44-53.

122. Randall, L.L., Hardy, J.S.S., Josefsson, L.G. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1209-1212.

123. Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T., Adesnik, M. (1982). J. Cell Biol. 92, 1-22.

124. Schleifer, K.H., Kandler, O. (1972). Bacteriol. Rev. 36, 407-477.

125. Schmitz, G. (1979). Diplomarbeit. Universität Tübingen.

126. Smith, W.P. (1980). J. Bacteriol. 141, 1142-1147.

127. Smith, J., Nikaido, H. (1978). J. Bacteriol. 135, 687-702.

128. Smith, W.P., Tai, P.C., Davis, B.D. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3501-3505.

129. Springer, W., Goebel, W. (1980). J. Bacteriol. 144, 53-59.

130. Stinson, M.W., Hayden, C. (1979). Infect. Immun. 25, 558-564.

131. Stinson, M.W., Merrick, J.M. (1974). J. Bacteriol. 119, 152-161.

132. Tai, P.C., Davis, B.D. (1982). In: Membranes and Transport, pp. 307-313. A.N. Martonosi (ed.). New York, Plenum.

133. Tweten, R.K., Jandolo, J.J. (1983). J. Bacteriol. 153, 297-303.

134. Varenne, S., Cavard, D., Lazdunski, C. (1981). Eur. J. Biochem. 116, 615-620.

135. Wagner, W., Vogel, M., Goebel, W. (1983). J. Bacteriol. 154, 200-210.

136. Walter, P., Blobel, G. (1981). J. Cell Biol. 91, 551-556.

137. Walter, P., Blobel, G. (1981). J. Cell Biol. 91, 557-561.

138. Walter, P., Ibrahimi, I., Blobel, G. (1981). J. Cell Biol. 91, 545-550.

139. Wanner, B.L., Sartny, A., Beckwith, J. (1979). J. Bacteriol. 140, 229-239.

140. Watts, C., Silver, P., Wickner, W. (1981). Cell 25, 347-353.

141. Wickner, W. (1979). Ann. Rev. Biochem. 48, 23-45.

142. Winkler, U., Heller, B., Felle, B. (1978). Arch. Microbiol. 116, 259-268.

143. Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2827-2831.

144. Yamada, M., Miki, T., Nakazawa, A. (1982). FEBS Lett. 150, 465-468.

145. Yamada, M., Nakamura, K., Inouye, M. (1981). J. Biol. Chem. 256, 2194-2198.

146. Zimmermann, R., Henning, B., Neupert, W. (1981). Eur. J. Biochem. 116, 455-460.

147. Zwilling, R. (1971). In: Immunologisches Praktikum. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

148. Zwizinski, C., Date, T., Wickner, W. (1981). J. Biol. Chem. 256, 3593-3597.

Lebenslauf

16. Sept. 1953	geboren in Mainz-Mombach
1960 - 1965	Volksschule in Mainz-Mombach
1965 - 1973	Maria-Ward-Gymnasium in Mainz
18. Mai 1973	Abitur
1973 - 1974	Leibniz Kolleg in Tübingen
ab WS 1973	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
16. Okt. 1975	Diplomvorprüfung
Juli - Okt. 1976	Studentenaustausch in Kanada
4. April 1979	Diplomhauptprüfung
ab Juli 1979	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut der Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, D. Ammermann, R.E. Bader, E.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, U. Feine, H. Frank, H.J. Gerth, K.G. Grell, J. Guglielmi, W.F. Haberlandt, K. Hantke, P. Hausen, V. Hemleben, G. Jung, E. Kallee, O. Klee, W. Löffler, D. Mecke, G.F. Meyer, G. Mickoleit, K. Pelling, K. Poralla, H. Probst, A. Riecker, E. Sander, B. Schwemmle, A. Seilacher, H. Seiler, W. Seyffert, D. Sperlich, G. Weitzel, P. Wenk, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)